



Universidad Zaragoza



“Modelos celulares de enfermedad mitocondrial causada por mutaciones en POLG”

**TRABAJO FINAL DEL MÁSTER DE BIOLOGÍA MOLECULAR
Y CELULAR**

Supervisado por Pilar Bayona Bafaluy y Nuria Garrido Pérez,
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

**Paula Gaudó Pardo
Septiembre 2016**

Índice

<u>Abreviaturas</u>	4
1. Resumen	6
2. Introducción	8
2.1. La mitocondria y el sistema de fosforilación oxidativa	8
2.2. El DNA mitocondrial y la DNA polimerasa mitocondrial	9
2.3. La DNA polimerasa gamma (POLG)	11
2.4. Enfermedades mitocondriales asociadas a mutaciones en POLG	12
2.5. POLG y neurodegeneración.....	13
2.6. Fosforilación oxidativa en la Enfermedad de Parkinson	14
2.7. Haplogrupos mitocondriales	15
3. Antecedentes y objetivos	16
4. Metodología	17
4.1. Kits y reactivos comerciales.....	17
4.2. Líneas celulares	18
4.3. Oligonucleótidos.....	18
4.4. Anticuerpos	19
4.5. Cultivos celulares eucariotas	19
4.5.1. Siembra y mantenimiento celular	20
4.5.2. Congelación y descongelación celular.....	20
4.5.3. Cuantificación de consumo de Oxígeno por Polarografía	21
4.5.4. Cultivo celular para inmunocitoquímica en líneas celulares eucariotas	21
4.6. Técnicas de manipulación de ácidos nucleicos	21
4.6.1. Extracción de RNA	21
4.6.2. Extracción de DNA.....	22
4.6.3. Cuantificación de material genético.....	22
4.6.4. RT-PCR	23
4.6.5. Amplificación de DNA mediante PCR	23
4.6.6. PCR cuantitativa (qPCR).....	25
4.6.7. Secuenciación	26
4.6.8. Electroforesis horizontal en geles de agarosa.....	26
4.6.9. Cuantificación de número de copias de DNA mitocondrial por qPCR	27
4.7. Técnicas de manipulación de proteínas	28
4.7.1. Extracción de proteínas.....	28
4.7.2. Cuantificación de proteínas por el método Bradford	28
4.7.3. Inmunocitoquímica	29
4.7.4. Western Blot.....	30
4.7.4.1. Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE	30
4.7.4.2. Transferencia de proteínas a membranas de PVDF	31
4.7.4.3. Incubación de la membrana con los anticuerpos.....	31
4.7.4.4. Detección quimioluminiscente.....	31
4.8. Detección de autofagia	32
4.9. Programas informáticos y análisis estadístico.....	32
5. Resultados	33
5.1. Generación de líneas celulares derivadas de SH-SY5Y que sobreexpresan variantes de POLG. 33	

5.2. Caracterización de líneas celulares derivadas de SH-SY5Y que sobreexpresan variantes de POLG	34
5.2.1. Análisis de transcritos de <i>POLG</i>	34
5.2.1.1. Análisis de las secuencias de <i>POLG</i> en las líneas generadas	34
5.2.1.2. Cuantificación de la expresión del transcrito de <i>POLG</i> en las líneas generadas	36
5.2.2. Estudio de la proteína POLG.....	37
5.2.2.1. Inmunocitoquímica en las líneas celulares con variantes de POLG	37
5.2.2.2. Detección de la proteína POLG en las líneas generadas	38
5.2.3. Estudio funcional.....	39
5.2.3.1. Cuantificación de consumo de Oxígeno por Polarografía	39
5.2.3.2. Cuantificación del número de copias de DNA mitocondrial	40
5.2.3.3. Expresión de las proteínas de los complejos de la cadena de transporte de electrones en las líneas generadas.....	41
5.2.3.4. Detección de autofagia en las líneas celulares generadas	42
5.3. Generación de híbridos derivados de neuroblastoma que sobreexpresan variantes de POLG .	43
5.4. Caracterización de híbridos derivados de neuroblastoma que sobreexpresan variantes de POLG	44
5.4.1. Análisis de transcritos de <i>POLG</i>	44
5.4.1.1. Análisis de las secuencias de <i>POLG</i> en los híbridos generados	44
5.4.1.2. Cuantificación de la expresión del transcrito de <i>POLG</i> en los híbridos generados	44
5.4.2. Estudio de la proteína POLG.....	48
5.4.2.1. Detección de la proteína POLG en los híbridos generados	48
6. Discusión.....	51
6.1. Análisis de las secuencias de <i>POLG</i> en las líneas generadas	51
6.2. Análisis de las líneas SH-SY5Y generadas	51
6.3. Análisis de los híbridos generados.....	53
7. Conclusiones	55
8. Perspectivas futuras	56
9. Bibliografía.....	56
ANEXO I. Secuenciación del tracto PoliQ del transcrito de <i>POLG</i> en los híbridos generados.	

Abreviaturas

AA/BA	Acrilamida/Bisacrilamida	LC3	Proteína asociada a microtúbulos de cadena ligera 1A/1B 3
ARCA	Ataxia autosómica hereditaria recesiva	LHON	Neuropatía óptica hereditaria de Leber
ATP	Adenosin trifosfato	MDS	Síndrome de depleción mitocondrial
ATPasa	ATP sintasa	MIM	Membrana interna mitocondrial
BSA	Seroalbúmina bovina	mtDNA	DNA mitocondrial
bp	Pares de bases	NADH	Nicotin adenin dinucleótido reducido
CoQ	Ubiquinona oxidada	nDNA	DNA nuclear
Cyt c	Citocromo c	OEP	Oftalmoplegia externa progresiva
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario	OXPHOS	Sistema de fosforilación oxidativa
CI	Complejo I	PBS	Tampón fosfato salino
CII	Complejo II	PBS-T	Tampón fosfato salino-Tween20
CIII	Complejo III	PCr	Fosfocreatina
CIV	Complejo IV	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
CV	Complejo V	PE	Fosfatidiletanolamina
DNA	Ácido desoxirribonucleico	PEO	Oftalmoplegia externa progresiva
dNTPs	desoxirribonucleótidos trifosfato	PoliQ	Tracto de poliglutaminas
EDTA	Ácido etilendiaminotetrácetico	PoliQ8	Tracto de 8 glutaminas
EIM	Espacio intermembrana	POLG	DNA polimerasa mitocondrial gamma
EP	Enfermedad de Parkinson		
ETC	Cadena de transporte de electrones		
FADH₂	Flavín adenín dinucleótido		
KCN	Cianuro de Potasio		

POLG A	Subunidad catalítica de la DNA polimerasa mitocondrial gamma	rRNA	RNA ribosómico
POLG B	Subunidad accesoria de la DNA polimerasa mitocondrial gamma	SDS	Dodecilsulfato sódico
PVDF	Fluoruro de polivinilideno	SDS-PAGE	Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
Q	Glutamina	SFB	Suero fetal bovino
qPCR	PCR cuantitativa	TCA	Ciclo del acido tricarboxílico
RNA	Ácido ribonucleico	T_m	Temperatura de fusión
ROS	Especies reactivas de oxígeno	tRNA	RNA de transferencia
		UNG	Uracil N glicosilasa

1. Resumen

Las enfermedades mitocondriales constituyen un grupo de trastornos originados por una deficiente síntesis de ATP por el sistema OXPHOS. Mutaciones en la DNA polimerasa mitocondrial gamma (POLG), única DNA polimerasa mitocondrial humana conocida y esencial para la replicación y reparación del DNA mitocondrial, producen diversas enfermedades mitocondriales con manifestaciones clínicas muy heterogéneas. Sin embargo, estas mutaciones tienen en común la presencia de diversos grados de afectación neuronal, que lleva a neurodegeneración. A pesar de que el cerebro representa solo el 2 % del peso corporal, consume el 20 % de la energía corporal. La mayor parte de esta energía es consumida por las neuronas y es el sistema OXPHOS el que la produce.

Con el objetivo final de caracterizar el efecto de mutaciones patológicas de la DNA polimerasa mitocondrial gamma en la diferenciación neuronal y en el sistema OXPHOS de neuronas maduras, en este trabajo, se han caracterizado a nivel genético, molecular y funcional líneas celulares derivadas de neuroblastoma (que pueden diferenciarse a neurona) sobreexpresando POLG silvestre, POLG con una variante portadora de una mutación autosómica dominante o POLG con una variante previamente asociada a Parkinson. Con estos estudios, hemos comprobado que la sobreexpresión de la mutación patológica afecta a la replicación del DNA mitocondrial en la línea SH-SY5Y en cultivo, quedando disponible para comenzar los estudios de diferenciación neuronal.

Por otro lado, se han caracterizado a nivel genético y molecular 3 líneas híbridas para los haplogrupos mitocondriales: H, UK y J, derivadas de neuroblastoma sobreexpresando POLG silvestre, o la variante de POLG previamente asociada a Parkinson. Una vez caracterizadas se estudiará el efecto combinado que pueden tener variaciones genéticas mitocondriales y nucleares en la diferenciación a neurona dopaminérgica.

Abstract

Mitochondrial DNA diseases constitute a group of disorders caused by ATP deficiency synthesis, carry through the OXPHOS system. DNA polymerase gamma (POLG) mutations, the only known DNA polymerase in human mitochondria and essential for mitochondrial DNA replication and repair, cause several mitochondrial diseases with very heterogeneous clinical manifestations. However, all these mutations have in common the presence of different severities of neuronal affectation, which lead to neurodegeneration. Despite the brain represents only the 2 % of the body weight, it consumes around 20 % of the body energy. Most of this energy is consumed by neurons and produced by the OXPHOS system.

Our final aim is to characterize the effect of pathologic mutations of the DNA polymerase gamma in neuronal differentiation and in the OXPHOS system of mature neurons. In this project, on the one hand, cells overexpressing a POLG variant carrying an autosomal dominant mutation or a POLG variant previously associated with Parkinson, derived from neuroblastoma, have been characterized at genetic, molecular and functional level. These studies have allowed us to see that the overexpression of the pathologic mutation impairs mitochondrial DNA replication in the cell line SH-SY5Y in culture, and it will be available to begin the neuronal differentiation studies.

On the other hand, we have characterized three transmitochondrial cybrid cell lines for mitochondrial haplogroups H, UK and J, derived from neuroblastoma overexpressing the wild type POLG variant, or the POLG variant previously associated with Parkinson. Afterwards, we will study the combined effect on the dopamine neuronal differentiation of mitochondrial and nuclear genetic variants.

2. Introducción

2.1. La mitocondria y el sistema de fosforilación oxidativa

La mitocondria es un orgánulo intracelular pequeño de dimensiones comprendidas entre 0,5-1 μm presente en la mayoría de las células eucariotas (Figura 1). La mitocondria tiene un origen endosimbiótico y conserva muchos vestigios de sus antepasados bacterianos, incluyendo una doble membrana y un genoma circular (el mtDNA), independiente del DNA nuclear (nDNA).

La mitocondria está formada por una doble membrana; la interna y la externa, las cuales definen dos espacios: la matriz mitocondrial y el espacio intermembrana. En la matriz se localizan las moléculas de DNA mitocondrial (mtDNA), las proteínas necesarias para su replicación y transcripción, los ribosomas necesarios en la traducción de las proteínas codificadas en el mtDNA, así como enzimas implicados en otros procesos metabólicos como el ciclo de Krebs o la β -oxidación de los ácidos grasos. La membrana externa es permeable para moléculas pequeñas (< 10 KDa), mientras que la interna es mucho más selectiva. Esta restricción al paso de moléculas por parte de la membrana interna es determinante para mantener el gradiente de protones necesario en la síntesis de adenosin trifosfato (ATP).

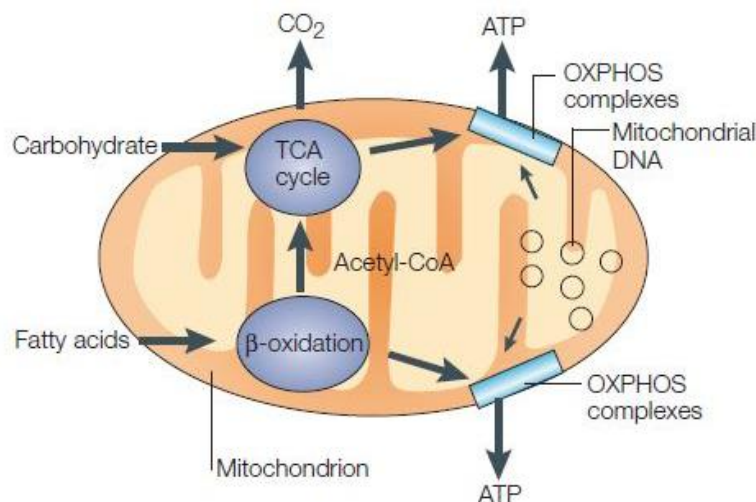


Figura 1. Esquema de la importancia del genoma mitocondrial y de las subunidades de los cinco complejos que componen el sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) de la membrana interna mitocondrial, donde se produce la síntesis de ATP. La reoxidación de los equivalentes reducidos (NADH (Nicotin adenin dinucleótido reducido) y FADH_2 (Flavín adenín dinucleótido reducido)) que son producidos por la oxidación de carbohidratos (el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA)) y los ácidos grasos (β -oxidación) están unidos a la generación del gradiente electroquímico a través de la membrana interna mitocondrial, los cuales son empleados por la ATP sintasa para conducir a la formación de ATP [2].

La mitocondria también interviene en la biosíntesis de otros componentes celulares: pirimidinas, fosfolípidos, nucleótidos, ácido fólico, grupo hemo y urea [4]. Además, desempeña un papel central en varios procesos celulares, fundamentalmente la muerte celular programada (apoptosis), la señalización intracelular mediada por calcio [6] y especies reactivas de oxígeno (ROS) [7].

Por otra parte, se ha considerado que una de las funciones fundamentales de la mitocondria es la oxidación de sustratos energéticos (metabolismo oxidativo), cuya finalidad es la de producir energía en forma de ATP. El sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) se compone de la ATP sintasa (complejo V) y la cadena de transporte de electrones (ETC), que incluye a los complejos respiratorios

I, III y IV, el citocromo c y el coenzima Q (Figura 2). Estos complejos se ensamblan entre sí de manera dinámica formando supercomplejos que permiten a la célula adaptarse a cambios de las fuentes de carbono y confeccionar una cadena de transporte electrónico a la medida de sus necesidades [8].

El paso de los electrones procedentes de nutrientes a través de los complejos de la ETC genera un gradiente electroquímico a través de la membrana mitocondrial interna, el cual se emplea para diversos fines como la producción de ATP y especies reactivas de oxígeno (ROS).

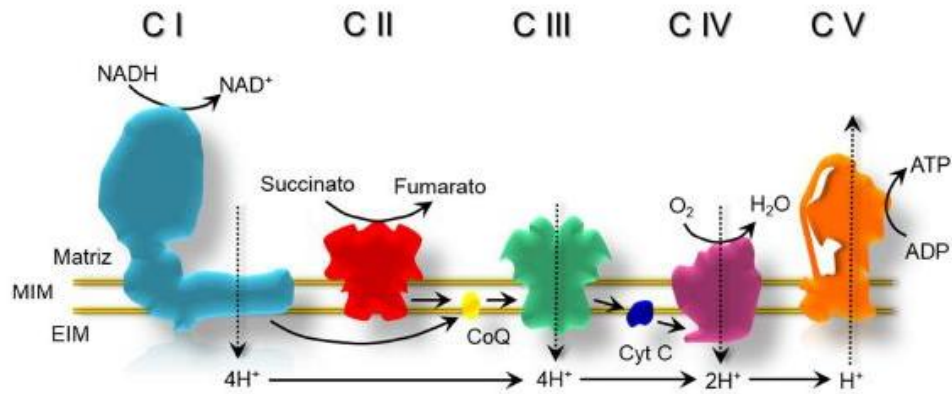


Figura 2. Sistema de Fosforilación Oxidativa (OXPHOS). El esquema muestra los complejos de la cadena respiratoria indicando en qué puntos se produce el bombeo de protones hacia la matriz mitocondrial. Cyt c: citocromo c. CoQ: ubiquinona oxidada. MIM: membrana interna mitocondrial. EIM: espacio intermembrana.

2.2. El DNA mitocondrial y la DNA polimerasa mitocondrial

El DNA mitocondrial (mtDNA) es una molécula circular de doble cadena de 16.569 pares de bases (pb) [9] que presenta una tasa de mutación superior a la del DNA nuclear.

El mtDNA se localiza en la matriz mitocondrial unido a la membrana mitocondrial interna, donde se encuentra embebida la cadena de transporte de electrones. El genoma mitocondrial es heredado por vía materna y codifica solo 13 polipéptidos que forman parte del sistema OXPHOS (siete polipéptidos del CI, uno del CIII, tres del CIV y dos del CV), 22 RNA de transferencia (tRNA) y 2 RNA ribosómicos (rRNA 12S y 16S) requeridos para su traducción (Figura 3). Todas las demás proteínas requeridas para mantener y expresar el mtDNA son codificadas por el genoma nuclear, son traducidas por ribosomas citoplasmáticos y transportadas a la mitocondria a través de diversos sistemas de importe de proteínas [10].

Dependiendo de su requerimiento energético, cada célula humana contiene cientos de mitocondrias, y cada una de ellas un número de copias que varía de 5 a 10. Por tanto, existen en cada célula de 1000 a 10000 copias de mtDNA, fenómeno llamado poliplasmia.

El mtDNA presenta una tasa de mutación espontánea que es entre 10-20 veces superior a la del nDNA. Este hecho se podría explicar por la elevada producción de radicales de oxígeno que se originan constantemente en la mitocondria y que dañan a un DNA con información genética muy compacta, que no está protegido por histonas, y en el que los mecanismos de reparación parecen ser insuficientes [11]. La carga acumulativa de múltiples mutaciones raras adquiridas que afectan la mayoría del mtDNA podrían perjudicar la función mitocondrial [12].

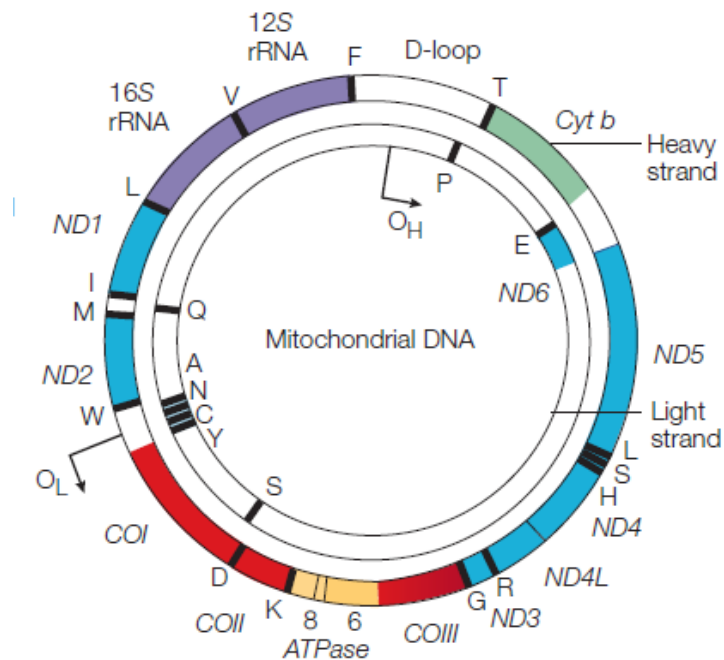


Figura 3. Mapa del genoma mitocondrial humano. Los genes que codifican las subunidades del complejo I (ND1-ND6 y ND4L) se muestran en azul; las subunidades de la citocromo c oxidasa (COI-COIII) se muestra en rojo; el citocromo b del complejo III se muestra en verde; y las subunidades de la ATP sintasa (ATPasa 6 y 8) se muestran en amarillo. Los dos RNAs ribosomales (rRNAs; 12S y 16S, se muestran en morado) y 22 tRNAs, indicados en líneas negras y anotadas con códigos de letras, las cuales son requeridas para la síntesis de proteínas mitocondriales se muestran también. El D-loop, o la región no codificante, contiene secuencias que son vitales para la iniciación de la replicación y transcripción del mtDNA, incluyendo el origen propuesto de la replicación de la cadena pesada (se muestra como O_H). El origen de la replicación de la cadena ligera se muestra como O_L [2].

Una de las características más singulares de las alteraciones del mtDNA es la heterogeneidad clínica, que va desde la afectación de un solo tejido u órgano hasta un fenotipo con afectación multisistémica. Una misma mutación puede dar lugar a cuadros clínicos diversos, mientras que distintas mutaciones pueden tener la misma manifestación fenotípica. Esto puede explicarse, en parte, por la coexistencia de dos tipos de mtDNA dentro de las células y tejidos, mtDNA mutante y mtDNA silvestre, situación conocida con el nombre de heteroplasmia. Sin embargo, si todas las células de un individuo normal tienen el mismo tipo de mtDNA se conoce como homoplasmia.

Por otra parte, la expresión fenotípica de una mutación patogénica del mtDNA no sigue las reglas de la genética mendeliana y depende generalmente de la proporción de mtDNA mutado que existe en un tejido en particular. El efecto umbral representa la proporción mínima de mtDNA mutado necesario para alterar el metabolismo oxidativo y suficiente para que se produzca una disfunción en un determinado órgano o tejido [13]. Del mismo modo, la fracción de mtDNA mutante puede variar de menos del 1% a más del 95% en los tejidos afectados de los pacientes con una enfermedad mitocondrial. Además, el grado de heteroplasmia varía de un tejido a otro, fundamentalmente afecta a aquellos que más dependen de la energía mitocondrial como son el sistema nervioso y el músculo cardíaco y estriado. Incluso puede variar entre las células de un mismo tejido [14] y, en algunos casos, la heteroplasmia puede cambiar con el tiempo [15]. Las mutaciones más severas, en general, se encuentran en estado heteroplásmico, ya que un estado homoplásmico mutante podría ser letal [16].

Un tipo de enfermedades originadas por mutaciones en el mtDNA se deben a la presencia de deleciones (pérdida de parte del DNA), que afectan a la biogénesis del sistema OXPHOS y por tanto a la síntesis de ATP.

Igualmente, pueden aparecer patologías, no solo por la presencia de mutaciones en el mtDNA, sino por una disminución considerable de los niveles del mismo (depleción de mtDNA). Los síndromes de depleción mitocondrial (MDS) son un grupo clínica y genéticamente muy heterogéneo, de herencia autosómica recesiva, caracterizados por una reducción del número de copias de mtDNA específica de tejido. Se considera que existe una depleción mitocondrial cuando los niveles de mtDNA están por debajo de 30% con respecto a controles emparejados por edad y sexo (en los casos graves se llega hasta valores por debajo de 5%) [17]. La mayoría de los pacientes con MSD mueren en su infancia temprana aunque algunos alcanzan hasta la pubertad e incluso mucho más [18]. No se ha identificado ninguna mutación en el mtDNA que pudiera ser responsable de esta depleción. Sin embargo, se han encontrado varios genes nucleares, implicados en la maquinaria de mantenimiento del mtDNA, que son responsables de las distintas formas de síndrome de depleción, como es el gen de la DNA polimerasa gamma (*POLG*) [19].

2.3. La DNA polimerasa gamma (*POLG*)

La DNA polimerasa gamma (*POLG*, de acuerdo con la nomenclatura HUGO) es responsable de la replicación y reparación del DNA en la mitocondria. El holoenzima de DNA polimerasa consiste en una subunidad catalítica *POLG A* (codificada por *POLG* en el locus cromosomal 15q25) y una forma dimérica en su subunidad accesorio *POLG B* (codificada por *POLG2* en el locus cromosomal 17q24.1). La subunidad catalítica es un enzima de 140 KDa que tiene actividades de DNA polimerasa, exonucleasa 3'-5' y liasa 5'dRP (5'-2-deoxiribosa-5-fosfato) (Figura 4) [20].

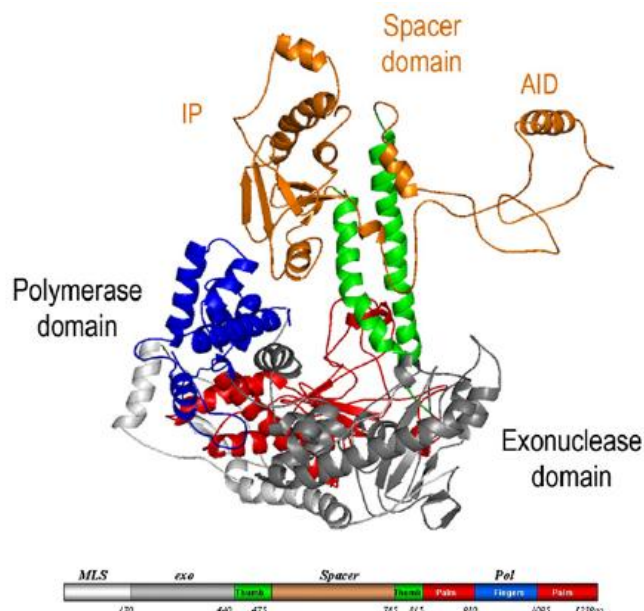


Figura 4. Estructura de la DNA polimerasa gamma (*POLG*). El dominio polimerasa muestra una configuración como de “mano derecha” con los dominios del dedo pulgar (verde), la palma (rojo) y los dedos (azul) y el dominio exonucleasa (gris). El dominio espaciador (naranja) presenta una única estructura que está dividida en dos subdominios. Además los dominios se muestran en una forma lineal donde el dominio N-terminal contiene los residuos 1-170; el dominio exonucleasa (exo), 171-440; el dominio espaciador (spacer), 476-785; y el dominio polimerasa (pol), 441-475 y 786-1239 [1].

2.4. Enfermedades mitocondriales asociadas a mutaciones en POLG

Se han identificado más de 200 mutaciones en el gen *POLG* (de acuerdo con la nomenclatura HUGO) asociadas a enfermedades mitocondriales [21] y muchas de ellas provocan depleción del mtDNA o acúmulo de deleciones o mutaciones puntuales. Las manifestaciones clínicas de muchas mutaciones son desconcertantes, porque pueden ser tanto autosómicas dominantes como recesivas. Más de 30 enfermedades severas en humanos han sido correlacionadas con mutaciones que afectan a *POLG* [22] [23] [24] .

Por un lado, se creó un “ratón mutador” que expresaba una versión deficiente en la corrección de errores o función exonucleasa 5’-3’ de la subunidad catalítica *POLG* de la DNA polimerasa gamma. Este ratón desarrolló un fenotipo mutador de mtDNA incrementando de 3 a 5 veces los niveles de mutaciones puntuales, al igual que la cantidad de mtDNA delecionado. Este incremento en mutaciones del mtDNA apareció asociado con un inicio prematuro de fenotipos relacionados con el envejecimiento como la pérdida de peso, la reducción de grasa subcutánea, la alopecia, osteoporosis, anemia, la reducción de la fertilidad y un aumento del tamaño del corazón. Además se detectó una reducción en la esperanza de vida y disfunciones en la cadena respiratoria [25] [26].

Por otro lado, las funciones críticas de la *POLG* en la síntesis del mtDNA podrían, en parte, razonar la diversidad y los efectos progresivos de las mutaciones de *POLG* en desórdenes degenerativos humanos. La determinación de la estructura de la *POLG* ha permitido entender mejor las diferencias entre distintas mutaciones en *POLG* y su asociación con enfermedades. Según el dominio al que afectan las mutaciones en *POLG* pueden dividirse en tres clases [1].

En primer lugar, la clase I contiene mutaciones en el sitio activo. Pertenecientes a este grupo son un grupo de sustituciones encontradas en pacientes de oftalmoplegia externa progresiva (PEO), R943H/C, Y995C y A957P/S. En general, las consecuencias de todas estas mutaciones son una disminución de la afinidad del enzima por los dNTPs, incrementando el ratio de error y/o reduciendo la catálisis [27]. Las mutaciones que dan lugar a estas proteínas tienden a conferir un fenotipo dominante, probablemente porque los enzimas mutantes compiten efectivamente con los enzimas silvestres para unirse a la cadena de DNA y causar una síntesis de DNA propensa al error. En ensayos *in vitro* mostraron que la sustitución de Y955C, correspondiente a la mutación c.2864A>G en la secuencia codificante [28], también incrementaba los errores de inserción de nucleótidos de 10 a 100 veces en ausencia de la corrección exonucleolítica [29]. Un modelo de ratón transgénico con el alelo *POLG* Y995C con diana en el corazón resultó en cardiomiopatía, pérdida de mtDNA e hipertrofia cardíaca [30].

En segundo lugar, la clase II incluye sustituciones localizadas en el canal de unión al DNA, reduciendo la afinidad de unión al DNA directamente. Entre ellas se encuentran las sustituciones de arginina, distribuidas a lo largo del canal de unión entre el molde de DNA y el oligonucleótido. Las sustituciones de argininas cargadas positivamente por residuos neutros disminuirán la actividad polimerasa y la unión al DNA. Por consiguiente, los mutantes de clase II tienden a ser recesivos, porque la *POLG* mutante es menos efectiva al competir con el enzima silvestre por el molde de DNA. La mutación W748S es comunmente asociada con ataxia autosómica hereditaria recesiva (ARCA) y con el síndrome de Alpers [31].

Por último, la clase III contiene sustituciones en la superficie de contacto de las subunidades POLG A y POLG B que interrumpen la interacción entre éstas. La mutación más común en POLG es A467T, que está asociada con un gran número de desórdenes mitocondriales. Por sus propiedades estructurales y bioquímicas, las mutaciones de clase III se espera que sean autosómicas recesivas. Si la superficie de contacto de la subunidad es defectuosa, conduce a una reducción de la procesividad de la polimerasa y la unión al DNA, defectos que pueden ser al menos compensados en heterocigóticos por la presencia del enzima silvestre [1].

La identificación clínica de enfermedades mitocondriales asociadas con mutaciones en POLG es complicada porque evolucionan con el tiempo y tienen un rango de solapamiento de síntomas, con implicación múltiple de órganos y con diferentes grados de severidad y tiempos de aparición [32] [33].

2.5. POLG y neurodegeneración

La característica común para la mayoría de pacientes con disfunciones del sistema de fosforilación oxidativa mitocondrial es la presencia de diversos grados de afectación neuronal, que lleva a neurodegeneración [34]. Las neuronas dependen de la función mitocondrial y del suministro de oxígeno debido a que la mayoría del ATP neuronal es producido por fosforilación oxidativa. A pesar de que el cerebro representa solo el 2 % del peso corporal, consume el 20 % de la energía corporal. La mayor parte de esta energía es consumida por las neuronas y es el sistema OXPHOS el que produce la mayor parte de esta energía [35].

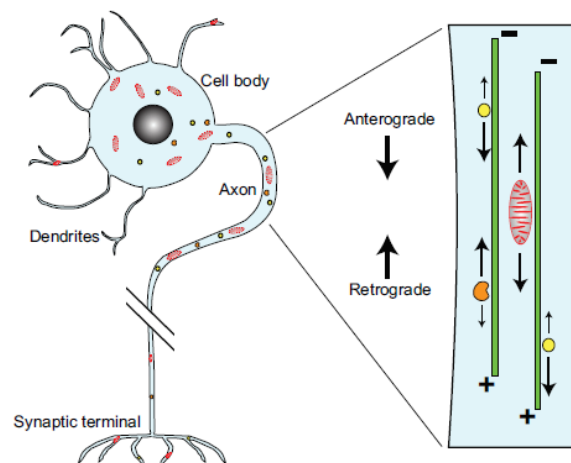


Figura 5. Morfología de la neurona y el transporte axonal. Morfología compleja caracterizada por la extensión de axones largos y ramificaciones de dendritas. El correcto funcionamiento de la neurona requiere el transporte a largas distancias a través del axón de componentes citoplasmáticos que incluyen mitocondrias (rojo), vesículas (amarillo), y orgánulos endocíticos (naranja). Un propósito principal de este transporte es enviar orgánulos recién sintetizados en el cuerpo celular hacia la terminal sináptica (transporte anterógrado) y devolver materiales envejecidos al cuerpo celular (retrógrado), para su degradación y reciclaje [3].

En cierto modo, para comprender la relación entre la mitocondria y la función neuronal, es importante considerar que las neuronas son células extremadamente polarizadas, con morfologías variadas y complejas, caracterizadas por la extensión de axones largos y ramificaciones de dendritas (Figura 5). Estas regiones tienen necesidades energéticas muy diversas, requieren elevados niveles

de ATP para mantener el transporte axonal de macromoléculas y orgánulos, como la mitocondria, para mantener gradientes iónicos y el potencial de membrana, para cargar las vesículas sinápticas con neurotransmisores y liberar neurotransmisores a la hendidura sináptica.

A pesar de que los sistemas de control de calidad mitocondrial son comunes a todos los tipos celulares; la elevada demanda energética, la mayor tendencia a acumular daños y las restricciones espaciales debidas a la peculiar morfología de las células, hacen que la disfunción mitocondrial afecte en mayor medida a las neuronas que a otros tipos celulares [36].

2.6. Fosforilación oxidativa en la Enfermedad de Parkinson

El Parkinson es una condición médica caracterizada por bradiquinesia, temblor, rigidez y reflejos posturales deteriorados. Además de los síntomas motores, pueden ocurrir trastornos mentales como depresión o psicosis y disfunción autonómica y gastrointestinal. El Parkinson es a menudo una enfermedad neurodegenerativa devastadora, crónica y progresiva. El envejecimiento es el factor de riesgo más importante asociado a la Enfermedad del Parkinson (EP) y como la población está envejeciendo en las sociedades occidentales, la EP está convirtiéndose en una enfermedad con proporciones epidémicas. La forma más frecuente (75%) de Parkinson es la enfermedad de Parkinson idiopática, que normalmente se refiere a un síndrome caracterizado por un inicio tardío, y es, en gran parte, Parkinsonismo no heredable.

La principal característica histopatológica de la Enfermedad del Parkinson es la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra, aunque cada vez existen más evidencias de anomalías bioquímicas y morfológicas generalizadas, tanto dentro como fuera del sistema nervioso central [37]. La pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra conduce a características motoras particulares, mientras que cambios neuronales más extendidos conducen a síntomas no motores variables y complejos. Se han descrito una serie de factores que contribuyen a la vulnerabilidad preferencial de las neuronas dopaminérgicas en la Enfermedad del Parkinson, tanto familiar como de aparición tardía. Entre ellos destacan elevadas demandas energéticas, el aumento del flujo de calcio y largos axones sin recubrimiento de mielina, que en conjunto incrementan el estrés oxidativo mitocondrial.

Sin embargo, los defectos en OXPHOS no siempre se han encontrado en pacientes de la Enfermedad de Parkinson, parece ser que dicha enfermedad es muy heterogénea. Observaciones previas en muchos tejidos aparentemente no afectados, confirman que una alteración en OXPHOS podría ser un evento patogénico sistémico en muchos casos de la Enfermedad del Parkinson.

Por otro lado, estudios de espectroscopía de resonancia magnética de cerebros de pacientes de Parkinson mostraron una disminución en los niveles de fosfato de elevada energía (adenosin trifosfato ATP y fosfocreatina PCr), incluso en pacientes de EP de aparición temprana, al igual que incrementos de los niveles de lactato. El sistema OXPHOS es el principal productor de ATP en neuronas, y la PCr es producida por la fosforilación de la creatina por el ATP. De este modo, anomalías metabólicas producidas en pacientes EP como bajos niveles de fosfato ricos en energía (ATP y fosfocreatina) o elevados niveles de lactato, son coherentes con una disfunción sistémica de OXPHOS. En la sustancia negra y en el cortex frontal de pacientes de EP se ha encontrado actividad reducida del CI. La disfunción de este complejo respiratorio podría ser sistémica, porque la actividad

disminuída del CI se ha demostrado en músculo, plaquetas, linfocitos y leucocitos de pacientes con la Enfermedad del Parkinson. Además, actividades de otros complejos como el CIV, también se han encontrado disminuídas en varios tejidos de EP, y análisis histoquímicos han mostrado una mejora significativa en la proporción de neuronas deficientes de CIV en la sustancia negra de pacientes de EP [38].

Varias familias con mutaciones en la DNA polimerasa gamma (POLG) padecen Parkinsonismo como consecuencia de la disfunción mitocondrial generada, habitualmente junto con otras manifestaciones clínicas como oftalmoplegia externa progresiva (OEP).

Por otro lado, se ha asociado la longitud del tracto de poliglutaminas (PoliQ) de la POLG con probabilidad de desarrollar Parkinson, especialmente en tractos con menos de 10 Q [39] [40]. En el extremo amino de la DNA polimerasa humana madura se localiza un tracto de 10 residuos de glutamina (Q) codificados por 10 codones CAG (frecuencia de >80%), seguidos de otras tres glutaminas codificadas por un codón CAA y dos codones CAG (PoliQ 13). Si varía el número de glutaminas codificadas por CAG del tracto PoliQ, manteniendo fijos los tres últimos codones CAA-CAG-CAG, POLG se podría ver afectada su capacidad de corrección e influenciar la función mitocondrial [41].

2.7. Haplogrupos mitocondriales

Muchas de las mutaciones que se produzcan en el mtDNA provocarán la aparición de una enfermedad y algunas podrían ser tan dañinas que harían inviables a los individuos que las poseen. Sin embargo, otras pueden ser inocuas y fijarse en la población como polimorfismos. Cada nueva mutación que se introduce producirá un genotipo mitocondrial o haplotipo ligeramente diferente del original, dando lugar a una nueva línea mitocondrial. El conjunto de haplotipos mitocondriales estrechamente relacionados se conoce como haplogrupo.

Las variantes genéticas que definen los haplogrupos afectan a todos los tipos de genes y, podrían ser factores de susceptibilidad para el desarrollo de determinados fenotipos. Se descubrió que un porcentaje elevado de los pacientes con neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON) pertenecía al haplogrupo mitocondrial J [42], además de individuos centenarios y pacientes con enfermedad de Parkinson [43]. El haplogrupo H es más frecuente en individuos con buena motilidad espermática [44]. Asimismo, en los últimos años se han asociado las variaciones en el mtDNA al cáncer, el envejecimiento y a enfermedades ligadas con la edad, lo que amplía el campo de la patología mitocondrial humana. Sin embargo, no siempre es posible asociar un haplogrupo determinado a un fenotipo concreto [45] [19].

3. Antecedentes y objetivos

Las neuronas dependen de la función mitocondrial y del suministro de oxígeno debido a que la mayoría del ATP neuronal es producido por fosforilación oxidativa. Por lo tanto, la mayoría de enfermedades relacionadas con disfunciones del sistema de fosforilación oxidativa mitocondrial tienen en común la afectación neuronal, que lleva a neurodegeneración [34]. Además, la importancia de la DNA polimerasa mitocondrial gamma en la síntesis del mtDNA podría ayudar a explicar los efectos progresivos de las mutaciones de POLG en desórdenes degenerativos humanos. Sin embargo, la identificación clínica de enfermedades mitocondriales asociadas con mutaciones en POLG es difícil debido, en gran parte, a la implicación múltiple de órganos y los diferentes grados de severidad [32] [33], y por tanto, resulta complicado disponer de buenos modelos para su estudio.

El presente trabajo final de máster se enmarca dentro de un proyecto que pretende estudiar el efecto de mutaciones patológicas de la DNA polimerasa mitocondrial gamma en la diferenciación neuronal y en el sistema OXPHOS de neuronas maduras. Para ello, se persigue la caracterización a nivel genético, molecular y funcional, de unas líneas celulares derivadas de neuroblastoma (SH-SY5Y), por su potencial para diferenciarse a neuronas. Estas líneas sobreexpresando POLG silvestre (SH-SY5Y POLG^{wt}), POLG con una variante portadora de una mutación autosómica dominante (SH-SY5Y POLG^{Y995C}) o POLG con una variante previamente asociada a Parkinson (SH-SY5Y POLG^{PoliQ8}).

Igualmente, se caracterizan 3 líneas híbridas de cada uno de los haplogrupos mitocondriales (H, UK y J) que sobreexpresan POLG (POLG^{wt}) o una variante previamente asociada a Parkinson (POLG^{PoliQ8}), para estudiar el efecto combinado que pueden tener variaciones genéticas mitocondriales y nucleares en la diferenciación a neurona dopaminérgica.

Objetivos concretos:

- I. Caracterizar a nivel genético y molecular líneas celulares derivadas de neuroblastoma SH-SY5Y que sobreexpresan distintas variantes de POLG (silvestre, mutación autosómica dominante Y995C y variación asociada a Parkinson, longitud del tracto PoliQ de 8 Q).
- II. Caracterizar la función OXPHOS en dichas líneas celulares.
- III. Caracterizar a nivel genético y molecular 3 líneas celulares de neuroblastoma de los haplogrupos de mtDNA (H, UK y J), que sobreexpresan la proteína POLG, o la variante con menor longitud del tracto PoliQ (5 Q en lugar de 8), previamente asociada a Parkinson.

4. Metodología

4.1. Kits y reactivos comerciales

Tabla 1. Kits y reactivos comerciales que se utilizaron durante el trabajo final de máster.

Nombre	Utilidad	Casa comercial
Reactivo de TRIzol®	Extracción de RNA	Life technologies
RNase A	Extracción DNA	Sigma
Proteinase K Solution (20 mg/mL), RNA grade	Extracción de DNA	Invitrogen
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Síntesis de cDNA	Roche Applied Science
Light Cycler® Fast Start DNA Master ^{PLUS} Sybr green I	Kit para qPCR	Thermo Fisher
DNA polimerasa Phusion Hot Start II High Fidelity	PCR	Thermo Fisher
Kit IBIAN PCR	Amplificación de DNA	IBIAN LAB
Low Mass Ladder	Marcador de pesos moleculares de DNA	Invitrogen
High Mass Ladder	Marcador de pesos moleculares de DNA	Invitrogen
UltraClean PCR Clean-Up Kit	Purificación de productos de PCR	MO BIO Laboratories
TaqMan® RNase P Control Reagents Kit	Cuantificación número de copias mtDNA	Applied Biosystems
TaqMan® Universal PCR Master Mix	Cuantificación número de copias mtDNA	Applied Biosystems
Proteasa inhibitor cocktail	Extracción de proteínas	Sigma
Reactivo de Bradford	Cuantificación de proteínas	Bio-Rad
Precision Plus dual Color	Marcador de pesos moleculares de proteínas	Bio-Rad
Membrana de PVDF	Transferencia de proteínas	Amersham
Papeles Whatman®	Transferencia de proteínas	Sigma
Rojo Ponceau	Tinción reversible de proteínas	Sigma
Clarity™ Western ECL Blotting Substrate	Detección de luminiscencia	Bio-Rad
Revelador Kodak® y fijador Kodak®	Revelado de autorradiografías	Sigma
MitoTracker® Red CMXRos	Detección de mitocondrias en inmunocitoquímica	Thermo Fisher
SlowFade® Gold Antifade Reagent with DAPI	Detección de núcleos celulares en inmunocitoquímica	Invitrogen

4.2. Líneas celulares

Se empleó la línea aneuploide SH-SY5Y, derivada de neuroblastoma humano (ATCC® CRL-2266™) obtenida en Sigma, por su potencial para diferenciarse a neurona.

Y los híbridos resultantes de la fusión de plaquetas (carentes de núcleo) de individuos con distintos haplotipos mitocondriales (H, K, J) con células de neuroblastoma humano SH-SY5Y sin mtDNA (Datos sin publicar).

Cada haplotipo presenta unos polimorfismos definidos, los cuales están localizados en regiones codificantes del mtDNA [46]. En el caso del haplotipo H, las sustituciones de nucleótidos que presentan son 7028C y 14766C [47] [48]; el haplotipo K presenta los polimorfismos A1811G, G9055A, A12308G, G12372A [48] [49]; y el haplogrupo J, presenta T4216C, A12612G, G13708A [50] [48].

4.3. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos que se emplearon en las reacciones de amplificación fueron diseñados específicamente para los genes diana (Tabla 2, Tabla 3, Tabla 4).

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en la secuenciación.

Oligonucleótido	Secuencia	% GC	Tm °C	Fragmento pb
POLGSmaIR	AGTAGTGCAGAGGGAAGCCATCCCAG	57,7	63,7	1843
POLG2F	ATGAGCCGCCTGCTCTGGAGG	66,7	64,1	
POLG307R	TGCGGCGCACCGCGCCTCG	85	66,1	307
POLG2F	ATGAGCCGCCTGCTCTGGAGG	66,7	64,1	
PolG2int	AGTGGGCCCCGTGCTCTGG	73,7	74	1394
PolG R (001)2	GCCTGAGTTTGGGAGCCTG	63,2	67,6	

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para la PCR cuantitativa (qPCR).

Oligonucleótido	Secuencia	% GC	Tm °C	Posición
POLG endo F	ACCGTGAGGACCGAGGAT	61	58	161-178
POLG endo R	CCTGTCACTGAAATGGGTTTG	48	54	202-222
POLG total F	ACGCCCATAAACGTATCAGC	50	59	2742-2761
POLG total R	CATAGTCGGGGTGCCTGA	61	60	2811-2828
β-actina F	CCAACCGCGAGAAGATGA	55	55	
β-actina R	CCAGAGGCGTACAGGGATAG	60	57	

Tabla 4. Oligonucleótidos y sonda utilizados para la cuantificación de mtDNA.

Oligonucleótido	Secuencia	Tm
12S-F	CCACGGGAAACAGCAGTGAT	58,4°C
12S-R	CTATTGACTTGGGTTAATCGTGTGA	58,2°C
Sonda MT-FAM MGB	FAM-TGC CAG CCA CCG CG	69,3°C

4.4. Anticuerpos

Para la inmunodetección de proteínas se emplearon los anticuerpos primarios y secundarios descritos en la Tabla 5.

Tabla 5. Anticuerpos primarios y secundarios para la inmunodetección de proteínas.

Nombre	PM proteína KDa	Dilución de trabajo	Origen	Monoclonal / Policlonal	Casa comercial y código
Anti-POLG	149	1:500	Conejo	Policlonal	Thermo scientific PA5-29676
Anti-actina	42	1:1000	Conejo	Policlonal	Sigma A2066
Anti-lámina β1	68	1:10000	Conejo	Policlonal	Abcam ab16048
Total OXPHOS Human WB Antibody Cocktail	ATPasa 54 KDa (CV)	1:1000	Ratón	Monoclonal	Abcam ab110411
	Core2 48 KDa (CIII)				
	SDHB 29 KDa (CII)				
	COXII 22 KDa (CIV)				
	Subunidad NDUFB8 18 KDa (CI)				
LC3B	LC3-I 16 KDa, LC3-II 14 KDa	1:1000	Conejo	Policlonal	Sigma L7543
Alexa Fluor® 488		1:500	Conejo	Policlonal	Abcam ab150077
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody		1:5000	Cabra	Policlonal	Thermo Scientific 31460
Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody		1:6000	Cabra	Policlonal	Thermo Scientific 31430

4.5. Cultivos celulares eucariotas

El trabajo con cultivos celulares se llevó a cabo en campanas de flujo laminar. Todo el material se esterilizó con etanol al 70 % y bajo luz UV. Los conductos empleados para succionar los medios de cultivo mediante bomba de vacío se lavaron con lejía al 20% tras cada uso y al finalizar la sesión de trabajo. Todos los medios usados para lavar, tripsinizar, centrifugar y cultivar las células se precalentaron a 37°C en un baño de agua. Todo el material en contacto directo con cultivos celulares fue deshechado en los contenedores adecuados para ser procesado por empresas especializadas.

Para crecer las líneas de neuroblastoma, SH-SY5Y y los híbridos derivados, se empleó medio de cultivo DMEM (GIBCO™) rico en glucosa 4,5 g/l, con piruvato de sodio 1 mM y L-glutamina 17 584 mg/l, suplementado con suero fetal bovino (SFB, Invitrogen) al 10%, el cual aporta proteínas y factores de crecimiento. El medio de galactosa consistió en medio DMEM sin glucosa, sin piruvato de sodio y con L-glutamina 17 584 mg/l (GIBCO™) suplementado con galactosa 0,9 g/l, piruvato de sodio 1 mM y suero fetal bovino (SFB, Invitrogen) al 10%.

4.5.1. Siembra y mantenimiento celular

Las células se sembraron en placas de Petri aptas para cultivo celular a una densidad entre 10.000-100.000 células/ml de medio de cultivo, a las que se añadió 0,2 ml de medio de cultivo/cm² de superficie de la placa. Los cultivos se mantuvieron durante su crecimiento en un incubador a 37°C, en atmósfera húmeda al 5% de CO₂, renovando el medio periódicamente cada 2-3 días. Cuando las células alcanzaron la confluencia en la placa de cultivo, se procedió a la resiembra mediante tripsinización ya que las líneas celulares empleadas son adherentes y crecen en monocapa. Para ello, se retiró el medio de cultivo por succión, se lavaron las células con PBS (GIBCO™) para eliminar las proteínas del suero que inhiben la acción de la tripsina y por último, se añadieron 0,033ml/cm² de una mezcla al 0,05% de tripsina (SIGMA) y 0,02% de EDTA en PBS (esterilizada mediante filtros 0,22 µm de tamaño de poro Stericup™ de Milipore), incubando durante 2-3 minutos a 37°C. Transcurrido este tiempo, se comprobó que las células se hubieran despegado y se recogieron en PBS al 10% SFB, pasándolas a un tubo Falcon de 15 ml para su posterior centrifugación (1.917 g, 5 minutos). El pellet celular se resuspendió en el volumen adecuado de medio de cultivo para su división, conteo o congelación inmediata.

4.5.2. Congelación y descongelación celular

Las células a congelar se dejaron crecer hasta alcanzar un 70-80% de confluencia en placas de 100 mm, se tripsinizaron y se recogieron por centrifugación. El pellet celular obtenido, se resuspendió en 500 µl de medio de congelación (DMEM con 10% de SFB y 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO, SIGMA) como agente crioprotector) pasándolo a un tubo criogénico resistente a N₂ líquido. Los criotubos se almacenaron en una caja de congelación con isopropanol a -80°C durante al menos un día, para favorecer la congelación paulatina y uniforme (descenso de aproximadamente 1°C/min). Tras 24h, se pasaron a un contenedor de N₂ líquido donde pueden mantenerse durante largos períodos de tiempo, incluso años, sin sufrir deterioro.

La descongelación de los criotubos almacenados se realizó diluyendo la suspensión y eliminando el agente preservante (DMSO) con la mayor rapidez posible. Para ello, se tomó el vial indicado del tanque de N₂ líquido y se descongeló en un baño a 37°C, tras lo cual se añadió la suspensión celular resultante a un tubo Falcon de 5 ml de solución de PBS al 10% de SFB y se centrifugó 2 minutos a 1.917 g para eliminar el DMSO. Se descartó el sobrenadante y el precipitado celular obtenido se resuspendió en medio de cultivo y se sembró en una placa de cultivo. Una vez que las células se adhirieron a la placa, se cambió el medio de cultivo para eliminar posibles trazas de DMSO que perjudicarían el crecimiento celular.

4.5.3. Cuantificación de consumo de Oxígeno por Polarografía

Para medir los niveles de Oxígeno consumido por las células en suspensión se utilizó un Oroboros equipado con un termostato Peltier y un agitador electromagnético (Figura 6). Las células se cultivaron en medio con galactosa durante los tres días previos a la cuantificación del consumo de oxígeno. Este medio obligó a las células a utilizar el sistema OXPHOS para generar ATP.



Figura 6. Aparato de Oroboros utilizado para cuantificar el consumo de Oxígeno de las células.

Se partió de tres frascos de cada muestra celular, se tripsinizaron y recogieron las células en medio con galactosa. Se centrifugaron durante 10 minutos y resuspendieron en 10 ml de medio con galactosa sin suero. A continuación, se realizó un conteo de células, y se resuspendieron en el volumen de medio necesario para verter en la cámara del Oroboro 1 millón de células por mililitro. La cámara se equilibró con aire a temperatura ambiente con agitación continua (750 rpm).

Cuando el consumo de oxígeno se estabilizó (tras 7 minutos aproximadamente), se introdujo cianuro de potasio (KCN), compuesto químico que inhibe el complejo IV respiratorio para excluir el consumo de oxígeno no debido a la cadena respiratoria [51] [52]. La pendiente obtenida tras añadir KCN se restó a la pendiente de respiración celular.

Las unidades en las que se obtuvo el consumo de oxígeno fueron de pmol de $O_2/s \times 10^6$ células.

4.5.4. Cultivo celular para inmunocitoquímica en líneas celulares eucariotas

Las células se tripsinizaron y sembraron en pocillos de placa de 6 sobre cubreobjetos debidamente esterilizados con etanol y secados, para obtener una confluencia de entre el 30 y el 50%. Las células se dejaron reposar durante al menos 12 horas para permitir su adherencia a los cubreobjetos.

4.6. Técnicas de manipulación de ácidos nucleicos

4.6.1. Extracción de RNA

Para extraer el RNA se siguió el protocolo del Reactivo de TRIzol® de Invitrogen. La extracción se realizó bajo la campana de flujo para evitar inhalar los reactivos tóxicos que se utilizaron. Además, para evitar la introducción accidental de RNAsas en la preparación y la consecuente degradación del RNA, se trabajó en las mayores condiciones de esterilidad posibles.

En tubo eppendorf con un pellet de aproximadamente 5×10^6 células se adicionó 0,5 ml de TRIzol®, el cual mantiene la integridad del RNA mientras lisa las células y disuelve los componentes celulares. Se pipeteó hasta asegurarse de resuspender totalmente el pellet. Seguidamente el homogeneizado se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la disociación completa de los complejos formados entre proteínas y ácidos nucleicos.

A continuación, se añadieron 0,2 ml de cloroformo por mililitro de TRIzol® utilizado, para realizar la separación de fases. Se agitó vigorosamente durante 15 segundos, se incubó a temperatura ambiente durante 2-3 minutos y se centrifugó a 12000 g durante 15 minutos a 4°C. Se observó la

aparición de distintas fases: una fase orgánica inferior de color rosa compuesta de fenol-cloroformo, una interfase blanca y una fase acuosa incolora en la parte superior. El RNA se encontraba exclusivamente en la fase acuosa. La fase acuosa se transfirió a otro eppendorf para continuar con la precipitación del RNA. Se añadieron 0,5 ml de isopropanol por cada mililitro de TRIzol® utilizado, incubándose a temperatura ambiente durante 10 minutos y centrifugando a 12000 g durante 10 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante con cuidado para evitar arrastrar el RNA precipitado depositado en el fondo del eppendorf. Para lavar el precipitado, se utilizó 1 ml de etanol al 75% en agua DEPC (dietilpírocarbonato, compuesto capaz de inhibir la actividad de las RNAsas) por cada mililitro de TRIzol® añadido. Se agitó con un vórtex y centrifugó a 7500 g durante 5 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se dejó secar al aire a temperatura ambiente. Finalmente, el precipitado de RNA se redisolvió en 60-100 µl de agua libre de RNAsas y se incubó a 60°C durante 10 minutos en agitación en el Thermomixer para garantizar su correcta disolución. Las muestras se cuantificaron empleando el espectrofotómetro Nanovue™ y se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

4.6.2. Extracción de DNA

El DNA se extrajo a partir de pellets derivados de entre 1 y 6×10^6 células mediante el método Fenol-Cloroformo. El pellet se incubó a 37°C durante toda la noche en 250 µl de tampón TE pH 7,5 (Tris 10 mM / EDTA 1 mM) con 1,25 µl de proteinasa K (20 mg/ml) para degradar proteínas, con 25 µl de Ribonucleasa A (10 mg/ml) que cataliza la degradación del RNA, y con 5 µl de SDS al 25%. Se llevaron a cabo dos extracciones con 1,5 volúmenes de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó la muestra y se centrifugó a 17895 g durante 5 minutos. Tras cada extracción, se recogió la fase acuosa (superior) en un nuevo tubo. A continuación, se llevó a cabo una extracción con 1 volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se agitó y centrifugó a 17.895 g durante 5 minutos, y se recogió la fase acuosa en un nuevo tubo. La precipitación del DNA se llevó a cabo mediante la adición de 0,1 volúmenes de acetato de amonio 7,5 M y 1,5 volúmenes de isopropanol frío, se mezclaron por inversión, momento en el cual se pudo observar el ovillo de DNA en suspensión, y se centrifugó a 17895 g durante 5 minutos a 4°C. A continuación, se desechó el sobrenadante, el pellet se lavó con etanol al 75% y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Por último, se eliminó el sobrenadante con mucho cuidado y se dejó secar. Una vez seco, el pellet se resuspendió en 75-100 µl de Tris-HCl 10 mM pH 8 o TE (10 mM Tris, 0,1 mM EDTA). Se almacenó a -20°C en el congelador hasta su utilización.

4.6.3. Cuantificación de material genético

Para determinar la concentración y la pureza del DNA o RNA en distintas muestras, se empleó el espectrofotómetro NanoVue™ que mide la absorbancia de la muestra a distintas longitudes de onda. La medida se realizó depositando 2 µl de la muestra en la placa del aparato y se obtuvieron directamente la concentración en ng/µl y los distintos valores de absorbancia. La pureza de la muestra viene dada por la relación de las absorbancias a 260 nm y 280 nm (A_{260}/A_{280}), en el caso del DNA una pureza aceptable oscilaría entre 1.7-1.9 y en el del RNA próxima a 2.

4.6.4. RT-PCR

A partir del RNA total aislado de suspensiones celulares, se sintetizó el DNA complementario (cDNA) mediante la reacción de retrotranscripción o transcripción inversa, utilizando el Kit *Roche Transcriptor First Stand cDNA Synthesis* (Tabla 1) en un termociclador.

En primer lugar, se mezclaron el RNA, el agua y el oligo(dT)₁₈ (Tabla 6) y se realizó una desnaturalización durante 10 minutos a 65°C para asegurar la desnaturalización de las estructuras secundarias del RNA. Tanto para las células SH-SY5Y como para los híbridos se partió de 1µg de RNA.

Tabla 6. Reactivos utilizados en la reacción previa de desnaturalización de RNA.

Reactivo	Volumen	Concentración final
RNA	Variable	1 µg de RNA total
Oligo(dT) ₁₈	1 µl	2,5 µM
Agua	Variable	Hasta 13 µl

A continuación se añadieron el resto de reactivos (Tabla 7) hasta completar un volumen de 20 µl. Se incubó una hora a 50°C y 5 minutos a 85°C para inactivar la transcriptasa reversa.

Tabla 7. Reactivos utilizados en la reacción de síntesis de cDNA.

Reactivo	Volumen	Concentración final
Tampón 5X	4 µl	1X
Inhibidor de RNasas 40U/ µl	0,5 µl	20U
dNTPs 10mM	2 µl	1mM
Transcriptasa Reversa 20U/ µl	0,5 µl	10U
Volumen final	20 µl	

4.6.5. Amplificación de DNA mediante PCR

La PCR o la Reacción en Cadena de la Polimerasa, permite obtener un gran número de copias de un fragmento de DNA de interés. Las PCR se realizaron en un termociclador, utilizando como molde el cDNA retrotranscrito a partir de RNA. La mezcla de PCR, de 50 µl de volumen final, contenía los componentes que se recogen en la Tabla 8.

Tabla 8. Reactivos para la reacción de PCR con la Taq DNA polimerasa de IBIAN.

Reactivo	Volumen (µl)	Concentración final
Tampón de reacción 10X	5	1X
Mix dNTPs (40mM)	1	0,2 mM
Oligonucleótido Directo (10 µM)	1	0,2 µM
Oligonucleótido Reverso (10 µM)	1	0,2 µM
IBIAN®-Taq DNA Polymerase	1	1,25 – 5 unidades
cDNA	5	
H ₂ O	36	
Total	50	

Las etapas que se realizaron para amplificar los fragmentos de DNA se muestran en la Tabla 9. Para la DNA polimerasa de IBIAN (Tabla 1) se estiman 30 segundos de extensión por cada 500 pares de bases.

Tabla 9. Programa de amplificación de DNA con la Taq DNA polimerasa de IBIAN.

Etapas	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	96°C	5 minutos
Desnaturalización	96°C	1 minuto
Hibridación	59°C	1 minuto
Extensión	72°C	2 minutos
Final de la reacción	72°C	5 minutos
	4°C	∞

Para amplificar los fragmentos que después se purificarían y se mandarían a secuenciar, se utilizó la DNA polimerasa *Phusion Hot Start II High Fidelity* (Tabla 1).

Los reactivos que se utilizaron para la reacción de PCR con la DNA polimerasa *Phusion* fueron los que se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Reactivos para la reacción de PCR con la DNA polimerasa *Phusion*.

Reactivo	Volumen (μl)	Concentración final
Tampón de reacción 5X	4	1X
Mix dNTPs 10mM	0,4	200 μM cada uno
Oligonucleótido Directo (10 μM)	1	0,5 μM
Oligonucleótido Reverso (10 μM)	1	0,5 μM
DNA polimerasa <i>Phusion Hot Start II High Fidelity</i>	0,2	0,02 unidades/μl
cDNA	2	
H ₂ O	11,4	
Total	20	

La temperatura de fusión (T_m del inglés *melting temperature*) de los oligonucleótidos se calculó mediante www.thermoscientific.com/pcrwebtools, el calculador de T_m de Thermo Scientific. Puesto que la T_m fue de 72°C, siguiendo las indicaciones del fabricante, la etapa de anillamiento y extensión se fusionó, y se realizaron las etapas como se muestran en la Tabla 11. Se estiman 15-30 segundos de extensión por kilobase.

Tabla 11. Programa de amplificación de DNA con la DNA polimerasa *Phusion*.

Etapas	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	98°C	30 segundos
Desnaturalización	98°C	20 segundos
Anillamiento/Extensión	72°C	1 minuto
Final de la reacción	72°C	5 minutos
	4°C	∞

30 ciclos

4.6.6. PCR cuantitativa (qPCR)

La PCR cuantitativa o PCR en tiempo real es una variante de la PCR convencional que permite cuantificar de manera absoluta el producto de amplificación en el Light Cyclor 2.0 de Roche. Se utilizó Sybr Green, un fluorocromo que se une inespecíficamente al DNA de doble cadena, permitiendo detectar la generación de productos específicos. Se trata de un método de gran sensibilidad que, tras cada ciclo de amplificación, mide el incremento de fluorescencia producido conforme se va sintetizando DNA. Se representa la intensidad de fluorescencia frente al número de ciclo de la PCR, siendo de interés el ciclo Ct aquel en el que la fluorescencia emitida supera el nivel umbral. También se obtiene la temperatura de fusión (T_m) del producto de reacción, que informa del grado de especificidad de la amplificación.

Se preparó la mezcla de reacción (Tabla 12) en los capilares adecuados para el Light Cyclor 2.0 de Roche, se centrifugaron a 1,3 g durante 1 minuto y se introdujeron en el carrusel del aparato. Las etapas que se llevaron a cabo se recogen en la Tabla 13.

Tabla 12. Reactivos y volúmenes de la reacción q-PCR.

Reactivos	Volumen
Mezcla de oligonucleótidos 5µM	0,5 µl
Mezcla SYBR Green	2 µl
cDNA	1 µl
Agua	6,5 µl
Volumen total/capilar	10 µl

Tabla 13. Programa de qPCR realizado en el Light Cyclor 2.0. de Roche.

	Etapas	Temperatura	Tiempo	Ciclos
	Desnaturalización	95°C	10 minutos	1
Cuantificación	Desnaturalización	95°C	10 segundos	55
	Anillamiento	60°C	10 segundos	
	Extensión	72°C	10 segundos	

Tras la PCR, las muestras se analizaron con el programa LightCycler Software 4.05.

Se hicieron duplicados o triplicados de todas las medidas. Los oligonucleótidos que se utilizaron se muestran en la Tabla 3. Para evitar posibles contaminaciones, las muestras se prepararon en campana de flujo laminar y el material se irradió previamente con luz UV. Las muestras con Sybr Green se mantuvieron en todo momento preservadas de la luz.

4.6.7. Secuenciación

La secuenciación de los fragmentos de DNA amplificados por PCR se realizó en el Servicio de secuenciación de la empresa SECUGEN.

Previo a la secuenciación de los productos amplificados por PCR mediante la DNA polimerasa *Phusion Hot Start II High Fidelity* (Tabla 1), se deben eliminar los restos de oligonucleótidos, dNTPs, enzimas y buffer. Para ello se utilizó el kit *UltraClean® PCR Clean-Up Kit* (Tabla 1) siguiendo las instrucciones del fabricante. La elución del DNA se efectuó en 25-50 µl de agua GIBCO o tampón de elución.

Para cada reacción de secuenciación se requirieron 15 µl del DNA purificado. Dependiendo del tamaño del fragmento de DNA amplificado, la concentración requerida varía. En la Tabla 14 se muestran las concentraciones necesarias de DNA en relación a su tamaño.

Tabla 14. Concentración de DNA necesaria para su secuenciación en función de su tamaño.

Tamaño del DNA	Concentración requerida (ng/µl)
Hasta 500 pb	10
De 500-1000 pb	20
De 1000-1500 pb	30
De 1500-2500 pb	40

Para cada fragmento de DNA que se secuenció se utilizaron oligonucleótidos específicos a una concentración de 5 µM. Los resultados de la secuenciación se analizaron con el programa *Codoncode Aligner v3.7.1*.

4.6.8. Electroforesis horizontal en geles de agarosa

La electroforesis horizontal en geles de agarosa se utilizó para separar distintos fragmentos de DNA en función de su tamaño utilizando el sistema de electroforesis Mini-Sub cell GT de BioRad. Se utilizaron geles de agarosa al 1% (p/v) que se prepararon disolviendo 0,5 gramos de agarosa en 50 ml de tampón de electroforesis TAE 1X (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM y EDTA 1 mM) calentando en microondas a unos 55°C. El tampón TAE proporciona un pH alcalino a la solución que hace que todos los grupos fosfato del DNA estén ionizados por completo y éste se mantenga cargado negativamente. Tras enfriarse la solución, se añadió bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 µg/ml, y se vertió sobre el molde del gel con un peine para delimitar los pocillos donde se cargarán las muestras. Se dejó enfriar hasta su completa polimerización.

Las muestras de DNA se mezclaron con el tampón de carga (Glicerol 10%, Tris- HCl 50 mM pH 6,8, SDS 2% (p/v), que proporciona densidad, facilitando su carga en el gel y además permite seguir el frente en el transcurso de la electroforesis.

La electroforesis se desarrolló en tampón TAE 1X aplicando un voltaje constante de 80-100 V, durante media hora.

4.6.9. Cuantificación de número de copias de DNA mitocondrial por qPCR

La cuantificación del número de copias de DNA mitocondrial por PCR cuantitativa se realizó en el aparato StepOne de Applied. Se utilizaron sondas de hidrólisis TaqMan.

Las sondas TaqMan son oligonucleótidos de unión específica al DNA diana marcados mediante dos fluorocromos. Su utilidad radica en que poseen un fluoróforo en su extremo 3' y una molécula en el 5' que bloquea su emisión de fluorescencia (denominada en inglés *quencher*); esta sonda marcada hibrida específicamente en la parte central del producto de PCR a obtener. De este modo, cuando se efectúa la PCR (con la sonda más el par de cebadores específicos), la sonda hibrida en el amplicón pero, debido a la cercanía del fluoróforo al *quencher*, no se emite fluorescencia; cuando la polimerasa se topa con la sonda la hidroliza mediante su actividad exonucleasa 5'-3', lo cual provoca la separación del *quencher* del fluorocromo y, por tanto, la emisión de fluorescencia, que está relacionada con la cantidad de amplicón producido [53].

Se utilizó como sonda mitocondrial el RNA ribosomal 12S, región conservada del mtDNA, marcada con un fluorocromo FAM. El fluorocromo FAM absorbe a una longitud de onda de 494 nm y emite a 518 nm. Los oligonucleótidos que se utilizaron para amplificar la sonda mitocondrial se recogen en la Tabla 4. Para normalizar, se utilizó una sonda que reconoce al gen nuclear RNasa P, del que habrá dos copias por célula, marcada con el fluorocromo VIC, que absorbe a una longitud de onda de 538 nm y emite a 554 nm. La sonda específica de RNasa P marcada con el fluoróforo VIC se obtuvo de la casa comercial Applied Biosystems (TaqMan® RNase P Control Reagents Kit de Applied Biosystems, Tabla 1), la cual ya contenía los oligonucleótidos en el mismo tubo (la casa comercial no proporciona las secuencias de éstos). También se obtuvo de esta casa comercial el Master Mix (TaqMan® Universal PCR Master Mix, Tabla 1) necesario para realizar la qPCR, con la DNA polimerasa, Uracil-N glicosilasa (UNG, enzima utilizado para eliminar productos de PCR residuales de previas amplificaciones de PCR), dNTPs con dUTP, ROX™ Passive Reference (colorante inerte cuya fluorescencia no cambia durante la reacción, se añade para normalizar las diferencias entre pocillos que pudieran ocurrir dadas por artefactos como el error de pipeteo o limitaciones del instrumento) y buffer.

Para realizar las rectas estándar se partió de una mezcla de dos plásmidos que contenían el gen mitocondrial y el nuclear. Esta mezcla contenía 9×10^6 copias del gen mitocondrial y 9×10^4 copias del gen nuclear. A partir de la misma se realizaron diluciones seriadas 1:3 en tampón Tris/HCl 10 mM pH 8,5.

Para preparar las muestras, se ajustó la concentración de DNA a aproximadamente 2 ng/μl (cargando 5 μl cada pocillo de la placa presentaba 10 ng).

Los reactivos que se utilizaron para la qPCR en un volumen final de 20 μl son los que se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15. Reactivos para la Real Time-PCR.

Reactivos	Concentración inicial	Volumen de reacción
Oligonucleótido Directo 12S-F	5 µM	0,5 µl
Oligonucleótido Reverso 12S-R	5 µM	0,5 µl
Sonda mitocondrial-FAM	5 µM	0,5 µl
RNAse P-VIC	20X	1 µl
H ₂ O		2,5 µl
DNA total		5 µl
Volumen Total		20 µl

La reacción de PCR se realizó en el aparato StepOne de Applied, y las condiciones que se llevaron a cabo son las que se detallan en la Tabla 16.

Tabla 16. Condiciones para la Real Time- PCR

Parámetro	Incubación UNG	Activación polimerasa	PCR (40 ciclos)	
	Incubación	Incubación	Desnaturalización	Anillamiento/Extensión
Temperatura	50°C	95°C	95°C	60°C
Tiempo	2 minutos	10 minutos	15 segundos	1 minuto

4.7. Técnicas de manipulación de proteínas

4.7.1. Extracción de proteínas

Se partió de un pellet de $1-6 \times 10^6$ células en tubo eppendorf. Para extraer las proteínas, se resuspendió el pellet de células en el tampón RIPA (Tris HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 50 mM, Tritón X-100%, deoxicalato de sodio 0,5%, EDTA 5 mM, esterilizado mediante autoclave) a 4°C y en una mezcla de inhibidores de proteasas (pepstatina 1 µg/ml, leupeptina 1 µg/ml, aprotinina 1 µg/ml, PMSF 1 mM) (Tabla 1). Se incubaron las muestras en una rueda giratoria a 4°C durante 15 minutos. A continuación, se centrifugaron a 13000 g a 4°C durante 15 minutos. Finalmente, se recogió el sobrenadante en un eppendorf nuevo, y se procedió a la medida de la concentración de proteínas en las muestras mediante el método Bradford.

4.7.2. Cuantificación de proteínas por el método Bradford

La cuantificación de la concentración proteica de los extractos celulares se llevó a cabo por espectrofotometría, utilizando el método Bradford. Se trata de un procedimiento simple y preciso para determinar la concentración de proteínas solubilizadas.

Esto supone adicionar azul de Coomassie a la solución de proteínas, el cual se une a los aminoácidos, especialmente a la arginina. Debido a que es una interacción relativamente inespecífica entre el colorante y las proteínas, es relativamente sensible a la presencia de contaminantes como restos de

detergente o líquidos orgánicos. Y seguidamente se mide la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro. La comparación con una curva estándar proporciona una medición relativa de la concentración de proteína.

En primer lugar se realizó una recta de calibrado formada por distintas diluciones de una solución de 1 mg/ml de seroalbúmina bovina (BSA) (0, 1, 2, 3, 5, 10, 15 µl) con 200 µl del reactivo Bradford y agua mili-Q hasta un volumen final de 1 ml. Se realizaron disoluciones de las muestras problema con 1 ó 2 µl de proteína en 1 ml. Las muestras se midieron por duplicado o triplicado. Se dejó desarrollar el color durante unos minutos a temperatura ambiente, y se procedió a la lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en una cubeta de plástico de 1 cm de longitud de paso.

Al representar los valores de Absorbancia (595 nm) frente a la concentración de proteína BSA (mg/ml), se obtuvo la recta patrón, que se ajusta a una ecuación del tipo $y = ax + b$; donde a es la pendiente de la recta. Comparando esta ecuación con la Ley de Beer-Lambert, la pendiente a se corresponde con el coeficiente de extinción molar (ϵ) a 595 nm. La concentración de proteínas en la muestra es:

$$[proteína] = \frac{Abs\ media}{\epsilon} \times 1000\ mg/ml$$

4.7.3. Inmunocitoquímica

Las células se sembraron como se indica en el apartado 4.5.4 (cultivo celular para inmunocitoquímica en líneas celulares eucariotas). Tras llegar a una confluencia de entre el 30 y el 50%, se retiró el medio de las células y se efectuó un lavado con PBS. Seguidamente se incubaron las células con un mililitro de MitoTracker® Red CMXRos (Invitrogen) en medio sin aditivos a una concentración final de 150 nM, durante media hora a 37°C. MitoTracker® Red CMXRos es un colorante mitocondrial fluorescente, capaz de teñir las mitocondrias de las células en cultivo. Su acumulación depende del potencial de membrana mitocondrial. A continuación se retiró dicho medio y se lavaron las células una vez con PBS durante 5 minutos en agitación.

Las células se fijaron en paraformaldehído al 2% durante 15 minutos a temperatura ambiente sin agitación. Se lavaron seguidamente tres veces con PBS durante 5 minutos en agitación suave. A continuación, se incubaron en metanol al 100% a -20°C durante 15 minutos en agitación suave para permeabilizar la membranas celulares. Con objeto de rehidratar las preparaciones, se efectuaron tres lavados con PBS en las mismas condiciones que los anteriores.

Se incubaron con el anticuerpo primario frente a POLG en una dilución 1:500 en PBS al 2% BSA durante 2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C en agitación suave. Se procedió a lavar las células tres veces con PBS en las mismas condiciones. Se añadió a continuación el anticuerpo secundario Alexa Fluor® 488 en una dilución 1:500 en PBS al 2% BSA durante 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad. Se volvieron a lavar las preparaciones tres veces con PBS en las mismas condiciones anteriores. Los cubreobjetos se colocaron sobre portaobjetos limpios y secos con una pequeña cantidad de solución de montaje SlowFade® Gold Antifade Reagent with DAPI (Invitrogen), de tal forma que las células fijadas quedasen entre las dos superficies de vidrio y éstas últimas adheridas entre sí mediante solución de montaje. Finalmente se dejaron secar las preparaciones en un ambiente fresco y protegido de la luz hasta su visualización en el microscopio de fluorescencia Zeiss.

4.7.4. Western Blot

4.7.4.1. Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE

La separación de proteínas se llevó a cabo mediante electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) utilizando el sistema de electroforesis de Miniprotean de BioRad.

Para esta electroforesis se requieren dos tipos de geles con diferente composición, el gel separador en el cual se separaran las proteínas y el gel concentrador donde se concentran las muestras. En el caso del gel separador, el porcentaje de acrilamida/bisacrilamida (AA/BA) varía en función del tamaño de la proteína de interés, siendo menor el porcentaje cuanto más grande es la proteína. En cambio, el porcentaje de AA/BA del gel concentrador es siempre del 2%. En nuestro caso, los geles que se utilizaron durante este trabajo final de máster fueron del 8%, 12,50% y 14% y la mezcla de los compuestos para obtener dichos porcentajes se recogen en la Tabla 17.

Tabla 17. Componentes necesarios para preparar los geles separador y concentrador para la electroforesis de proteínas SDS-PAGE.

	Gel separador			Gel concentrador
	8%	12,50%	14%	
Acrilamida:Bisacrilamida (30:0,8)	1,333 ml	2,125 ml	2,33 ml	0,333 ml
Tampón 4X*	1,250 ml	1,25 ml	1,25 ml	0,5 ml
H₂O mili-Q	2,420 ml	1,5 ml	1,42 ml	1,167 ml
APS 20%	15 µl	30 µl	30 µl	20 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl

*Tampón 4X: Tampón del gel separador 4X: Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, SDS 0,4%, EDTA 8 mM. Tampón del gel concentrador 4X: Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, SDS 0,4%, EDTA 8 mM.

En primer lugar, se preparó el gel separador y se vertió entre los cristales que forman el soporte (de 1mm de anchura), dejando unos 2 cm por encima para el gel concentrador. Seguidamente, se añadió una capa de isopropanol para formar un frente recto y evitar la posible entrada de oxígeno que dificultaría la polimerización. Tras la polimerización del gel separador, se eliminó el isopropanol y se lavó la superficie con agua destilada. El exceso de agua se retiró con un papel y se preparó el gel concentrador con los componentes presentes en la Tabla 17. Se vertió el gel concentrador hasta rebosar, se insertó el peine para delimitar los pocillos, el cual debe ser del mismo tamaño que la anchura entre los dos cristales del soporte, y se dejó polimerizar. A continuación, se retiró el peine y se montaron los geles en vertical en la cubeta de electroforesis. Tras añadir el tampón de electroforesis (Running buffer) 1X a la cubeta, se limpiaron los pocillos a presión con ayuda de una jeringuilla, para eliminar la acrilamida que se hubiera podido quedar en ellos y facilitar la entrada de las proteínas. Se cargaron las muestras de proteínas (de 20 a 40 µg), mezcladas con 3 µl de tampón de carga 4X (Glicerol 10%, Tris- HCl 50 mM pH 6,8, SDS 2% (p/v), azul de bromofenol 0,02% (p/v), β-mercaptoetanol 1% (v/v)) y agua hasta 12 µl. El marcador de pesos moleculares que se empleó fue el Precision Plus Protein Standards, de Bio-Rad (Tabla 1).

La electroforesis se desarrolló con una intensidad de corriente constante de 12 mA por gel hasta que las muestras atravesaron el gel concentrador y llegaron al separador, momento en el que se incrementó la intensidad a 20 mA por gel hasta el fin de la electroforesis.

4.7.4.2. Transferencia de proteínas a membranas de PVDF

La transferencia de las proteínas desde el gel de electroforesis a membranas de PVDF se realizó mediante electrotransferencia húmeda, utilizando el sistema Trans-Blot Cell de Bio-Rad. Para ello, se cortó un rectángulo de la membrana de PVDF (Polifluoruro de vinilideno Hybond-P de Amersham) adecuado al tamaño del gel, se activó con metanol durante 10 segundos y se lavó con agua destilada. A continuación, la membrana se sumergió en el tampón de transferencia frío o BSN (Tris 48 mM, glicina 39 mM, metanol 20% (v/v)) durante unos minutos. Simultáneamente, se prepararon cuatro papeles Whatman® (Tabla 1) y dos esponjas para cada gel junto con los soportes. Cuando todo estaba equilibrado en buffer BSN, se procedió a montar el sistema, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La transferencia se realizó a 4°C en la cámara fría a 80 V durante 2 horas o a 30 V durante toda la noche.

La eficiencia de la transferencia se comprobó mediante la tinción reversible con Rojo Ponceau (SIGMA) (Tabla 1), que tiñe las proteínas y permite observar todas las proteínas presentes en la membrana. Tras observar que efectivamente la transferencia se había realizado de forma adecuada, la membrana se lavó con agua destilada varias veces.

Posteriormente, se incubó la membrana con una disolución de leche desnatada en polvo al 0,25% en PBS-T (Tween20 al 0,1% en PBS (Tampón Fosfato Salino)), durante toda la noche a 4°C o durante 1 hora a temperatura ambiente, para bloquear los posibles sitios de unión inespecíficos y evitar así falsos positivos en la detección proteica.

4.7.4.3. Incubación de la membrana con los anticuerpos

Antes de realizar la incubación con el anticuerpo primario, se eliminó el exceso de agente bloqueante mediante 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS-T. Tanto los lavados como las incubaciones se llevaron a cabo en cubetas con agitación suave a temperatura ambiente. La membrana se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo primario diluido a la proporción adecuada (Tabla 5) en una disolución de PBS-T al 0,25% de leche desnatada en polvo. Pasado este tiempo, se retiró la solución y se realizaron tres lavados con PBS-T de 5 minutos cada uno. El anticuerpo secundario (anti IgG de conejo o de ratón, según el origen del anticuerpo primario) conjugado con una peroxidasa de rábano se diluyó a la proporción correspondiente en PBS-T al 0,25% de leche y se incubó la membrana durante 1 hora. Finalmente, se retiró el anticuerpo secundario (Tabla 5) y se realizaron los últimos 3 lavados de 5 minutos con PBS-T.

4.7.4.4. Detección quimioluminiscente

Para detectar las proteínas presentes en la membrana se utilizó un sistema de inmunodetección indirecta. Este sistema se basa en la utilización de un anticuerpo primario para localizar la proteína de interés, y un anticuerpo secundario que detecta al primario y que, además, está conjugado con una peroxidasa, que al entrar en contacto con su sustrato quimioluminiscente (ECL de Amersham, Tabla 1), el luminol, produce una señal luminosa.

El reactivo ECL se preparó y se guardó durante 5 minutos preservándolo de la luz. Seguidamente, la membrana se incubó durante 5 minutos con el sustrato quimioluminiscente y la luz emitida en dicha reacción quedó impresa en una película de autorradiografía. Para ello, se introdujo la membrana en una funda de plástico transparente y se puso en contacto con la película de autorradiografía, realizando exposiciones de distinta duración. El revelado se realizó sumergiendo la película de autorradiografía durante aproximadamente un minuto en el líquido revelador de Kodak® (SIGMA, Tabla 1), seguidamente se lavó la película en agua destilada y la señal obtenida se fijó durante 1 minuto sumergiéndola en el líquido fijador Kodak® (SIGMA, Tabla 1).

4.8. Detección de autofagia

Para cuantificar autofagia en células de mamífero, el indicador más importante del incremento de la formación y maduración de autofagosomas es la presencia de la proteína LC3-II en los inmunoblots, que se corresponde con la forma lipídica de la proteína autofagosomal LC3 (proteína asociada a microtúbulos de cadena ligera 1A/1B 3) [54] [55] [56].

Se puede detectar la conversión de LC3 (LC3-I a LC3-II) por análisis de inmunoblot, porque la cantidad de LC3-II está claramente relacionada con el número de autofagosomas. La LC3 endógena es detectada como dos bandas en Western Blots: una representa LC3-I, la cual es citosólica, y otra LC3-II, la cual está conjugada al fosfatidiletanolamina (PE) y está presente en aislamiento de membranas y autofosoma [57] [58]. Aunque el peso molecular de LC3-II es mayor que el de LC3-I dado por la adición de PE, LC3-II migra más rápido en SDS-PAGE probablemente por su extremo hidrofóbico. LC3-I es usualmente detectada en un gel a una masa molecular de 16KDa, y LC3-II aproximadamente a 14KDa. La cantidad de LC3-II está correlacionada con el número de autofagosomas, sirviendo como un buen indicador de la formación de autofagosomas [57]. Sin embargo, LC3-II puede autodegradarse por autofagia, por lo tanto, la detección por inmunoblot de LC3 puede ser interpretada inadecuadamente. Por ello, el mejor indicador de autofagia es el ratio LC3-II/LC3-I o el ratio LC3-II/(LC3-I + LC3-II) [59].

Por tanto, se realizó un Western Blot utilizando el anticuerpo anti-LC3B que detectará LC3-I y LC3-II.

4.9. Programas informáticos y análisis estadístico

Se realizó el alineamiento de las secuencias de *POLG* mediante el programa *Codoncode Aligner* v3.7.1. Con el programa *ImageJ* se cuantificó, mediante densitometría, la expresión de *POLG* en las líneas celulares generadas respecto a la línea control. Mediante *StatView* se realizó un análisis estadístico ANOVA t-test, considerándose significativos los valores de *p* menores de 0.05 o 0.005 (**p*<0.05, ***p*<0.005).

5. Resultados

El gen *POLG*, codifica la subunidad catalítica de la DNA polimerasa gamma mitocondrial. El transcrito consenso se identifica con los siguientes códigos: ENST00000268124 (Ensembl), CCDS10350.1 (CCDS) o P54098 (Uniprot), NM_002693.2 (RefSeq).

La secuencia codificante, o marco abierto de lectura del gen (ORF) de 3720 pb, se clonó previamente en el laboratorio partiendo de material genético de una línea celular en cultivo.

5.1. Generación de líneas celulares derivadas de SH-SY5Y que sobreexpresan variantes de *POLG*

Entre las variaciones de *POLG* asociadas a enfermedades de la cadena respiratoria, se escogió la sustitución patológica p.Tyr955Cys, correspondiente a la mutación c.2864A>G en la secuencia codificante, dada su severidad en pacientes [28].

Por otra parte, *POLG* contiene una serie de repeticiones CAG que codifican glutamina (Q) y constituyen el tracto poliglutamina (PoliQ). La extensión en la secuencia consenso es de 10 Q seguidas de otras 3 codificadas por CAA-CAG-CAG, pero puede variar entre individuos y especies. Una longitud menor del tracto PoliQ se ha asociado con susceptibilidad a padecer Parkinson. Para generar una línea SH-SY5Y derivada que sirviera como modelo de estudio, se buscó un tracto PoliQ que difiriera del alelo consenso de 10 Q y, a ser posible, con menor número de glutaminas [40]. Dado que no se disponía de muestras humanas con tractos de PoliQ diferentes de 10, se empleó el tracto PoliQ de una especie de chimpancé denominada Bonobo, que posee 5 Q (más las 3 Q finales conservadas codificadas por CAA-CAG-CAG).

Las líneas celulares que expresan la proteína *POLG* o sus variantes de manera estable, se generaron previamente en nuestro laboratorio mediante transfección celular con vectores lentivirales.

Se utilizó un plásmido que contenía clonado el gen que se deseaba expresar: *POLG* silvestre (*POLG*^{wt}), *POLG* con un tracto PoliQ de 8 glutaminas (*POLG*^{PoliQ8}) y *POLG* con la variación patológica Y995C (*POLG*^{Y955C}).

La transfección se llevó a cabo con baja multiplicidad de infección (MOI), con el objetivo de no introducir más de una copia del gen por célula. En el caso de la variación patológica Y995C, se llevó a cabo una segunda transfección con elevada multiplicidad de infección. La población celular transfectada se seleccionó utilizando la resistencia a neomicina incluida en el vector. Se generaron así las líneas celulares SH-SY5Y *POLG*^{wt}, SH-SY5Y *POLG*^{Y955C}, SH-SY5Y *POLG*^{Y955C(altaMOI)} y SH-SY5Y *POLG*^{PoliQ8} que se han utilizado en el presente trabajo de máster.

5.2. Caracterización de líneas celulares derivadas de SH-SY5Y que sobreexpresan variantes de POLG

5.2.1. Análisis de transcritos de *POLG*

5.2.1.1. Análisis de las secuencias de *POLG* en las líneas generadas

En este trabajo se han caracterizado las líneas previamente generadas. Se comenzó secuenciando las diferentes líneas para determinar la longitud del tracto PoliQ y el nucleótido presente en la posición 2864 de la secuencia codificante del gen *POLG*.

Primero, partiendo de RNA total obtenido de las líneas celulares SH-SY5Y, SH-SY5Y *POLG*^{wt}, SH-SY5Y *POLG*^{PoliQ8}, SH-SY5Y *POLG*^{Y955C} y SH-SY5Y *POLG*^{Y955C(altaMOI)} se realizó una retrotranscripción para sintetizar el DNA complementario (cDNA), utilizando el Kit *Roche Transcriptor First Stand cDNA Synthesis* (Tabla 1).

Para determinar el nucleótido presente en la posición 2864 de la secuencia codificante del gen *POLG*, se utilizaron los primers *PolG2int* y *POLG R(001)2* que se recogen en la Tabla 2. Las amplificaciones mediante PCR se realizaron mediante la DNA polimerasa *Phusion Hot Start II High Fidelity* (Tabla 1). La Figura 7 muestra el electroferograma obtenido en la secuenciación.

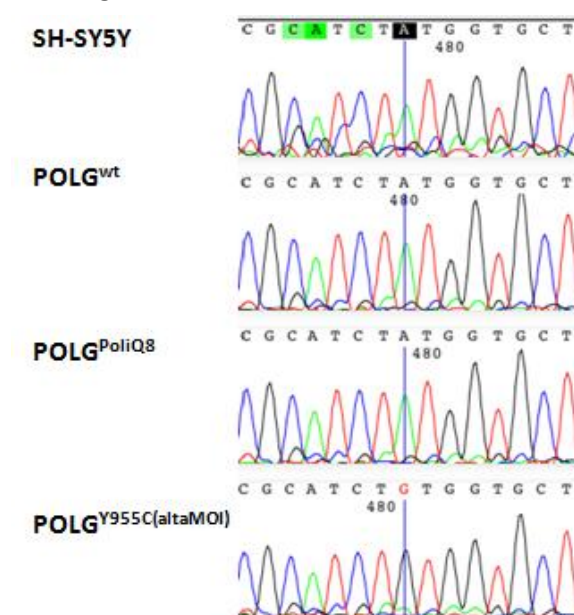


Figura 7. Secuenciación para determinar el nucleótido presente en la posición 2864 en la secuencia codificante del gen *POLG* en las líneas celulares generadas. Electroferograma obtenido en la secuenciación del gen *POLG* en las líneas celulares SH-SY5Y, SH-SY5Y *POLG*^{wt} (*POLG*^{wt}), SH-SY5Y *POLG*^{PoliQ8} (*POLG*^{PoliQ8}), SH-SY5Y *POLG*^{Y955C} (*POLG*^{Y955C}) y SH-SY5Y *POLG*^{Y955C(altaMOI)} (*POLG*^{Y955C(altaMOI)}) para determinar el nucleótido de la posición 2864. Código de colores de bases nitrogenadas: adenina (A): verde, timina (T): rojo, guanina (G): negro, citosina (C): azul.

En la Figura 7, el nucleótido en la posición 2864 corresponde con la línea azul. En el caso de las líneas celulares SH-SY5Y, SH-SY5Y *POLG*^{wt} y SH-SY5Y *POLG*^{PoliQ8} el nucleótido presente en la posición 2864 es una Adenina, es decir, no se ha incorporado ninguna mutación. Como se esperaba, el nucleótido presente en la posición 2864 para la línea celular SH-SY5Y *POLG*^{Y955C(altaMOI)} es una Guanina. Sin embargo, no se ha podido detectar el nucleótido Guanina en la posición 2864 en la línea celular SH-SY5Y *POLG*^{Y955C} (no se muestra en la figura), de todos modos, se continuaron los ensayos con esta línea celular.

Para amplificar el tracto PoliQ presente en la secuencia del gen *POLG*, se utilizaron dos parejas de oligonucleótidos: POLG307R y POLG2F, que amplificaban un fragmento de 307 pb; y POLGSmaIR y POLG2F, que amplificaban un fragmento de 1843 pb (Tabla 2). Tras varios intentos de amplificación de ambos fragmentos con la DNA polimerasa de IBIAN, se consiguió una mayor concentración de DNA cuando se amplificaba el fragmento largo de 1843 pb con la DNA polimerasa *Phusion Hot Start II High Fidelity* (Tabla 1). En la Figura 8, se muestra el electroferograma obtenido en la secuenciación, mediante un oligonucleótido reverso, del tracto PoliQ en las líneas celulares generadas.

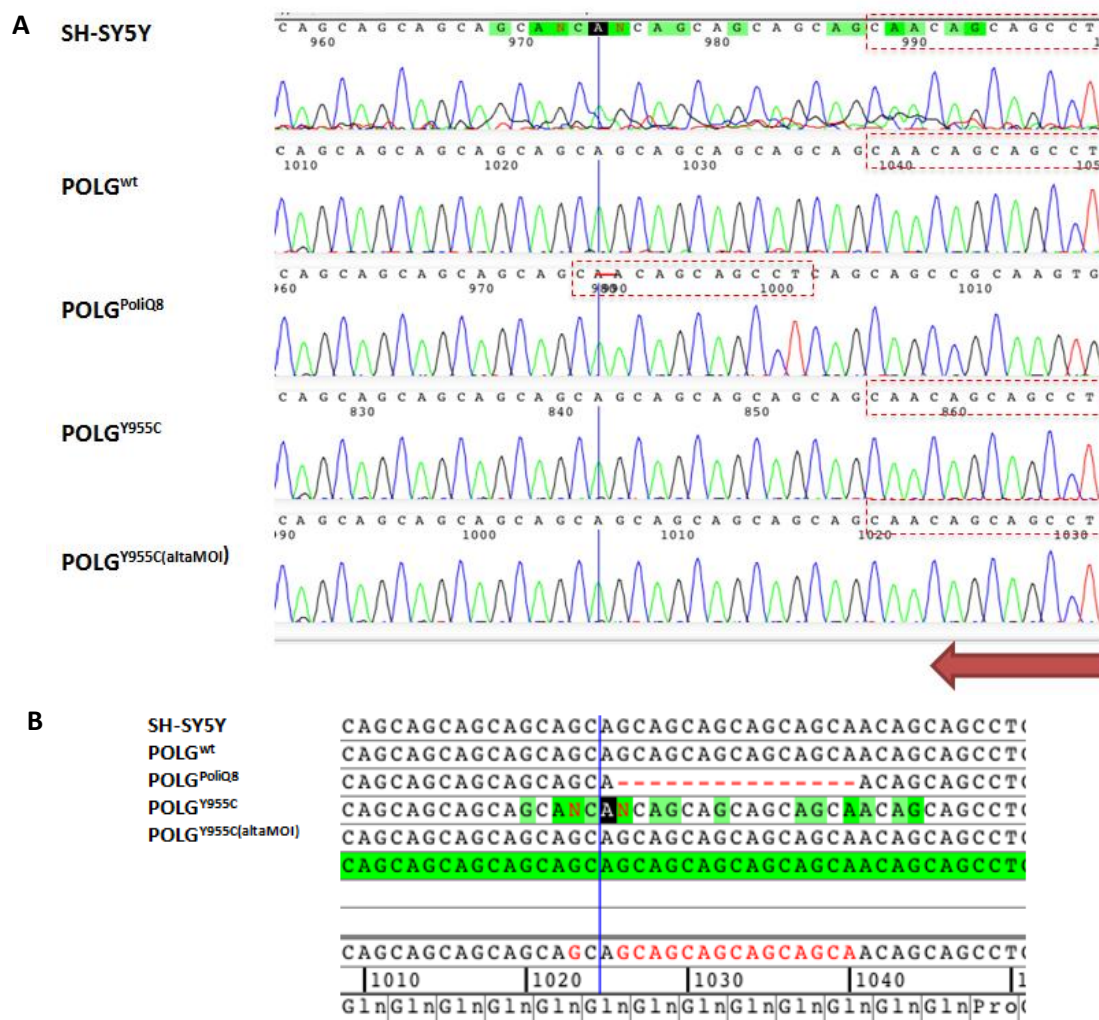


Figura 8. Secuenciación del tracto PoliQ del transcrito de *POLG* en las líneas celulares generadas. A. Electroferograma obtenido en la secuenciación del gen *POLG* en las líneas celulares SH-SY5Y, SH-SY5Y POLG^{wt} (POLG^{wt}), SH-SY5Y POLG^{PoliQ8} (POLG^{PoliQ8}), SH-SY5Y POLG^{Y955C} (POLG^{Y955C}) y SH-SY5Y POLG^{Y955C(altaMOI)} (POLG^{Y955C(altaMOI)}). Código de colores de bases nitrogenadas: adenina (A): verde, timina (T): rojo, guanina (G): negro, citosina (C): azul. La dirección de la secuenciación está indicada por la flecha roja, de derecha a izquierda. B. Se muestra el alineamiento de la secuencia consenso del gen *POLG* (secuencia subrayada en color verde) con las secuencias obtenidas en la secuenciación mediante *Codon code Aligner*. La línea discontinua indica la posición de las 5 Q seguidas codificadas por CAG del tracto PoliQ variable que restan hasta las 10 Q codificadas por CAG conservadas en la especie humana.

La flecha roja indica la dirección de la secuencia. En los electroferogramas (Figura 8 A) se encuadran en rojo los codones CAA-CAG-CAG que codifican para las tres glutaminas conservadas del tracto. El número de glutaminas previas, codificadas por CAG, son 10 en todas las líneas celulares excepto SH-SY5Y POLG^{PoliQ8}. En el caso de SH-SY5Y POLG^{PoliQ8}, solo se detectan 5 glutaminas correspondientes

al tracto variable derivado de Bonobo. A pesar de estar en heterocigosis, no se detecta el alelo de 13 Q.

En la Figura 8 B, la línea discontinua indica la posición de las 5 glutaminas del tracto PoliQ variable que restan hasta las 10 glutaminas conservadas en la especie humana. En el resto de líneas celulares se observan 10 glutaminas en el tracto variable más las 3 glutaminas conservadas.

Tras determinar que la línea celular SH-SY5Y $POLG^{Y955C(altaMOI)}$ presentaba el nucleótido Guanina en la posición 2864 en lugar de Adenina; y que SH-SY5Y $POLG^{PoliQ8}$ presentaba un tracto de 8 glutaminas, 5 Q en el tracto variable codificadas todas ellas por CAG y 3 Q conservadas; se pudo continuar con la caracterización de las líneas celulares.

5.2.1.2. Cuantificación de la expresión del transcrito de *POLG* en las líneas generadas

Para confirmar que las líneas generadas expresaban las variantes de *POLG* esperadas, se cuantificó la cantidad de mRNA correspondiente a la proteína mediante PCR cuantitativa (qPCR). Por una parte, se cuantificó la expresión del gen *POLG* endógeno para cada línea celular con un par de oligonucleótidos (Tabla 3) que hibridan en la región no codificante 5'UTR del gen. Y por otro lado, se cuantificó la expresión total del gen tras la transfección (endógeno y exógeno) mediante el diseño de oligonucleótidos dirigidos a la secuencia codificante, puesto que la secuencia sobreexpresada es la secuencia codificante sin región UTR.

Como control, se cuantificó la expresión del transcrito de *POLG* en células SH-SY5Y sin transfectar, para así contemplar los posibles cambios compensatorios en la expresión del gen endógeno. Se realizaron duplicados biológicos, obteniendo de cada muestra de 6 a 8 medidas. Se muestra a continuación el número de veces que aumenta la expresión del transcrito en las líneas transfectadas respecto al control (Figura 9).

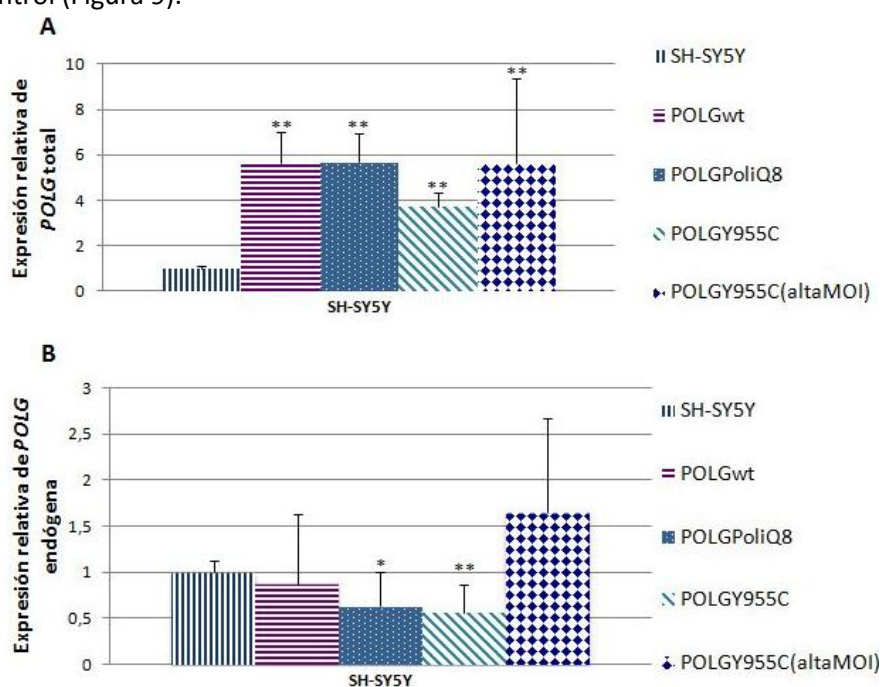


Figura 9. Cuantificación de la sobreexpresión del transcrito de *POLG* mediante q-PCR. A. Expresión relativa de *POLG* total en las líneas generadas SH-SY5Y, SH-SY5Y $POLG^{wt}$ ($POLG^{wt}$), SH-SY5Y $POLG^{PoliQ8}$ ($POLG^{PoliQ8}$), SH-SY5Y $POLG^{Y955C}$ ($POLG^{Y955C}$) y SH-SY5Y $POLG^{Y955C(altaMOI)}$ ($POLG^{Y955C(altaMOI)}$). Se incluye la desviación estándar de las medidas. B. Expresión relativa de *POLG* total en las líneas generadas. Se incluye la desviación estándar de las medidas. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$

Todas las líneas transfectadas mostraron aumento significativo de expresión de *POLG* total (Figura 9 A). La mayor tasa de sobreexpresión se dio al transfectar con la variante *POLG*^{PoliQ8} (SH-SY5Y *POLG*^{PoliQ8}) aumentando hasta 5,7 veces su expresión respecto a la línea control (SH-SY5Y). También fueron significativos los cambios en las expresiones al transfectar con la variante silvestre (SH-SY5Y *POLG*^{wt}) y con *POLG*^{Y995C(altaMOI)} (SH-SY5Y *POLG*^{Y995C(altaMOI)}), con valores de expresión de hasta 5,65 y 5,66, respectivamente, respecto la línea control. La menor tasa significativa de sobreexpresión se dio con la línea celular SH-SY5Y portadora de la mutación Y995C (SH-SY5Y *POLG*^{Y995C}), con valores de hasta 3,8 veces la expresión de la línea control.

La expresión del gen *POLG* endógeno se vio significativamente disminuída en las líneas transfectadas SH-SY5Y *POLG*^{PoliQ8} y SH-SY5Y *POLG*^{Y995C}, (Figura 9 B), probablemente debido a que la célula presenta mecanismos que regulan su cantidad de DNA endógeno.

5.2.2. Estudio de la proteína POLG

5.2.2.1. Inmunocitoquímica en las líneas celulares con variantes de POLG

Se determinó la localización subcelular de la proteína *POLG* mediante inmunocitoquímica en las diferentes líneas (SH-SY5Y, SH-SY5Y *POLG*^{wt}, SH-SY5Y *POLG*^{PoliQ8} y SH-SY5Y *POLG*^{Y995C}).

En la Figura 10, primera columna, se muestran las células incubadas con DAPI, colorante nuclear fluorescente azul; en la segunda columna se muestran incubadas con MitoTracker® Red CMXRos (Invitrogen), colorante mitocondrial fluorescente rojo, cuya acumulación depende del potencial de membrana mitocondrial; en la siguiente columna, se aprecian las células incubadas con el anticuerpo frente a *POLG*; y la última columna muestra la combinación de las imágenes capturadas con cada incubación.

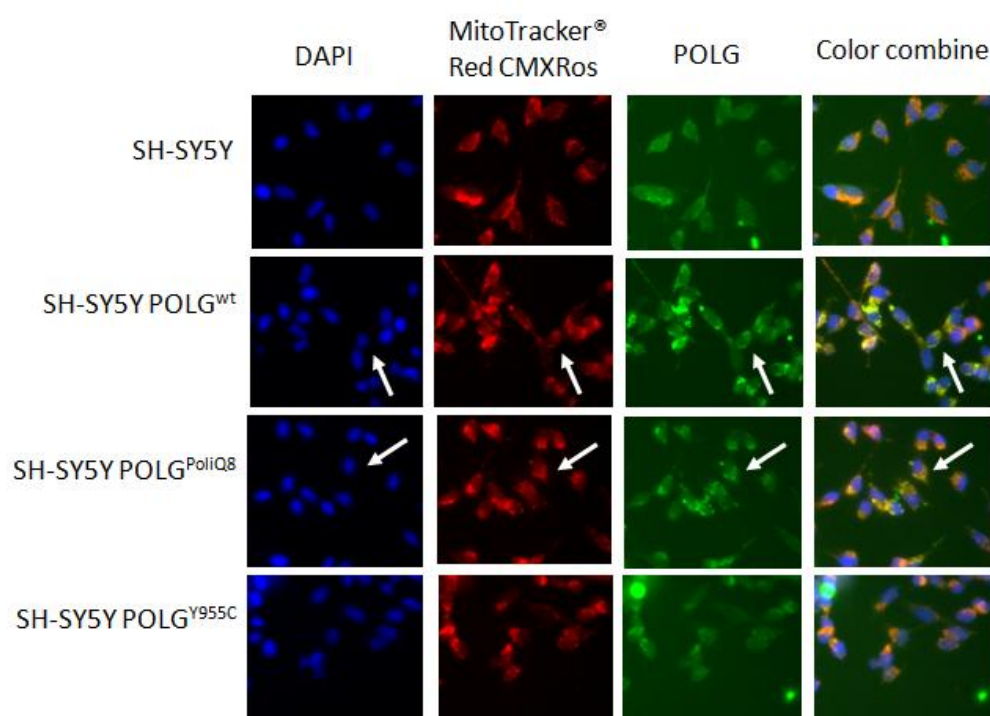


Figura 10. Inmunocitoquímica de las líneas celulares SH-SY5Y, SH-SY5Y *POLG*^{wt}, SH-SY5Y *POLG*^{PoliQ8} y SH-SY5Y *POLG*^{Y995C}. Se muestran los núcleos teñidos por DAPI (azul) (primera columna), las mitocondrias por MitoTracker® Red CMXRos (rojo) (segunda columna), la proteína *POLG* (verde) (tercera columna), y una combinación de colores de las capturas realizadas con cada tinción (cuarta columna).

Como se puede observar en la Figura 10, el marcaje de la proteína POLG mostró una localización mitocondrial, coincidiendo con el marcaje obtenido con la sonda mitocondrial MitoTracker Red.

Se encontraron sin embargo diferencias entre el marcaje para POLG en las distintas líneas celulares. Se pudo apreciar una mayor acumulación de la proteína POLG, punteado más brillante, en las líneas SH-SY5Y POLG^{wt} y SH-SY5Y POLG^{PoliQ8}. En cambio, la distribución de POLG en la línea celular con la mutación, SH-SY5Y POLG^{Y955C}, fue más difusa y uniforme, hecho que corresponde con menores niveles de mRNA y proteína obtenidos en qPCR y Western Blot (ver apartados 5.2.1.2. y 5.2.2.2. respectivamente), en esta variante.

5.2.2.2. Detección de la proteína POLG en las líneas generadas

Mediante un análisis Western Blot con el anticuerpo policlonal para POLG se detectaron los niveles de expresión de la proteína. Se normalizó la cantidad de proteína en cada línea respecto a su control de actina, y se realizaron medidas de densitometría calculándose el porcentaje de sobreexpresión respecto a la línea sin transfectar SH-SY5Y.

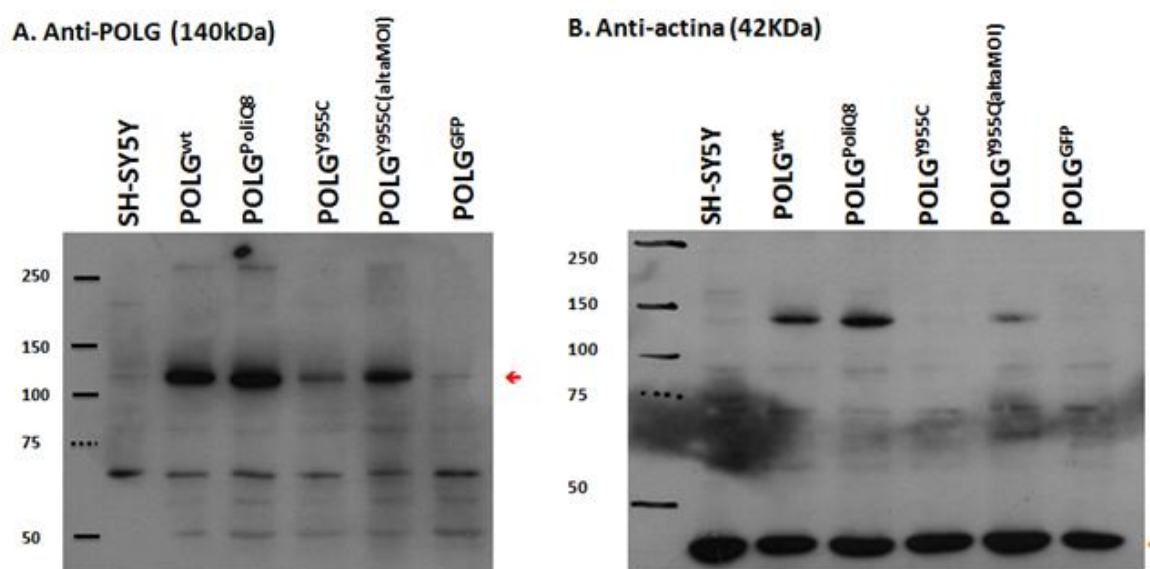


Figura 11. Inmunodetección en geles del 8% AA/BA con 40µg de muestra / calle. A. Inmunodetección de la proteína POLG de 140KDa en células SH-SY5Y, SH-SY5Y POLG^{wt} (POLGwt), SH-SY5Y POLG^{PoliQ8} (POLGPoliQ8), SH-SY5Y POLG^{Y955C} (POLGY955C), SH-SY5Y POLG^{Y955C(altaMOI)} (POLGY955C(altaMOI)) y SH-SY5Y POLG^{GFP} (POLG^{GFP}). B. Inmunodetección de la proteína α- actina de 42KDa en las mismas líneas celulares.

La Figura 11 muestra la sobreexpresión de la proteína POLG (banda a 140 KDa) en las líneas celulares. La mayor sobreexpresión de POLG tuvo lugar al transfectar con el tracto de 8 glutaminas (SH-SY5Y POLG^{PoliQ8}), seguido de la proteína silvestre (SH-SY5Y POLG^{wt}), y seguido de la línea transfectada con la proteína mutada con alta multiplicidad de infección (SH-SY5Y POLG^{Y955C(altaMOI)}). La línea mutante SH-SY5Y POLG^{Y955C} presentó menor sobreexpresión de POLG que las demás líneas celulares.

El nivel de expresión de POLG en la línea celular aumentaba hasta 100 veces al transfectarla con la variante POLG con el tracto PoliQ8 (SH-SY5Y POLG^{PoliQ8}), y hasta 60 veces en el caso de las células transfectadas con la proteína silvestre (SH-SY5Y POLG^{wt}), siendo considerablemente menor la sobreexpresión, en torno a 20 veces, al transfectar con la variante Y955C (SH-SY5Y POLG^{Y955C}) (Figura 12).

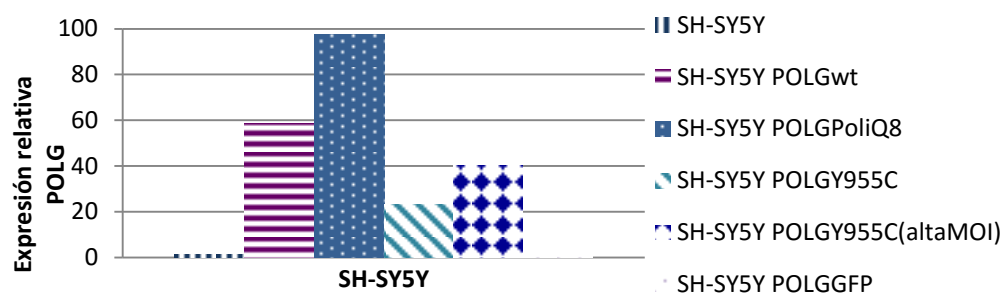


Figura 12. Cuantificación mediante densitometría (ImageJ) de la expresión de POLG en cada línea celular respecto a la línea no transfectada SH-SY5Y.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que la técnica de Western Blot es semicuantitativa, muestra diferencias entre las líneas celulares pero la cuantificación puede estar sobreestimada.

5.2.3. Estudio funcional

5.2.3.1. Cuantificación de consumo de Oxígeno por Polarografía

Para medir los niveles de Oxígeno consumido por las células SH-SY5Y, SH-SY5Y POLG^{wt}, SH-SY5Y POLG^{PoliQ8}, SH-SY5Y POLG^{Y955C} y SH-SY5Y POLG^{Y955C(altaMOI)}, se utilizó un Oroboros.

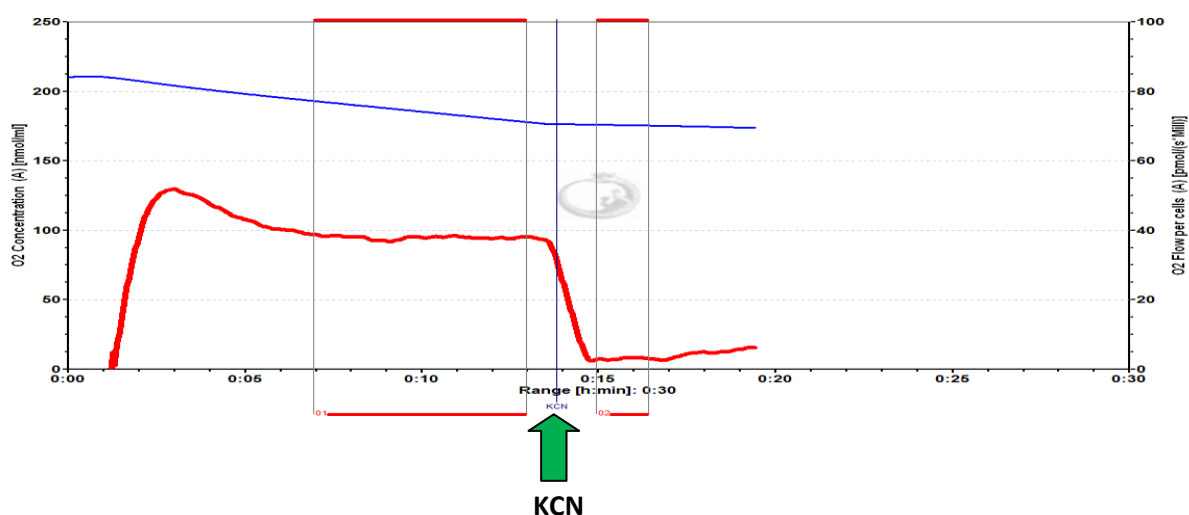


Figura 13. Gráfica de consumo de oxígeno de la línea celular SH-SY5Y POLG^{wt} realizada en Oroboros. La línea azul (superior) representa la concentración de oxígeno (nmol/ml) con el tiempo (horas:minutos); y la línea roja (inferior) representa el flujo de oxígeno por célula (pmol de O₂/s x 10⁶ células con el tiempo (horas:minutos).

En la Figura 13 se puede observar la gráfica que se obtiene de las medidas del Oroboros. Corresponde a una de las medidas de consumo de O₂ de la línea que sobreexpresa la POLG silvestre (SH-SY5Y POLG^{wt}).

La línea azul representa el consumo de oxígeno en el tiempo (nmol/ml minutos). La línea roja representa la variación del flujo de oxígeno por célula en el tiempo (pmol de O₂ s⁻¹ 10⁶ células). La flecha verde indica la adición de KCN, cuando el consumo de oxígeno se ha estabilizado, observándose una caída del flujo de oxígeno por millón de células.

Los datos que se obtuvieron para las distintas líneas celulares se muestran en la Figura 14, en todos los casos se ha eliminado la respiración residual tras añadir KCN.

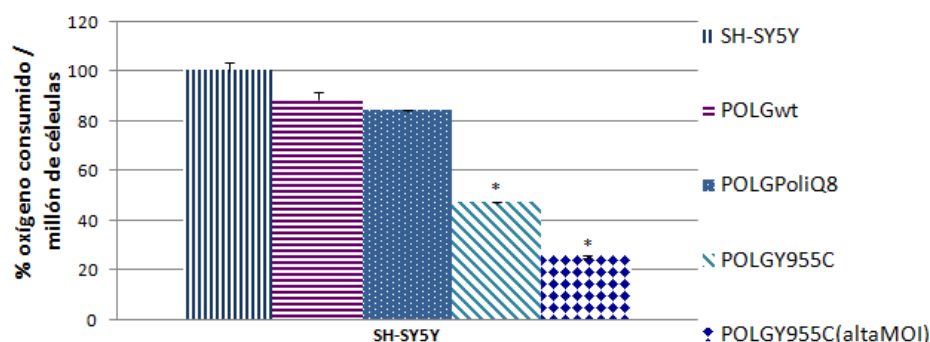


Figura 14. Consumo de O₂ relativo a la línea control. % de Oxígeno consumido/millón de células medido por Oroboros en las líneas celulares SH-SY5Y, SH-SY5Y POLG^{wt} (POLGwt), SH-SY5Y POLG^{PoliQ8} (POLGPoliQ8), SH-SY5Y POLG^{Y955C} (POLGY955C) y SH-SY5Y POLG^{Y955C(altaMOI)} (POLGY955C(altaMOI)). *p<0.05.

Se aprecia una disminución significativa del consumo de oxígeno de SH-SY5Y POLG^{Y955C} y SH-SY5Y POLG^{Y955C(altaMOI)}. Con valores del 47% y 26% respectivamente de oxígeno consumido por millón de células, al compararlas con la línea control. Es decir, las células que expresan la variante de POLG con la mutación Y955C presentan una menor tasa de respiración que las células que expresan las otras variantes.

5.2.3.2. Cuantificación del número de copias de DNA mitocondrial

Un elevado número de pacientes con mutaciones en la DNA polimerasa gamma (POLG) presentan depleción en el DNA mitocondrial. Por ello, se procedió a determinar la cantidad de DNA mitocondrial frente a DNA nuclear presente en las células. Se utilizó la PCR cuantitativa, detectando el DNA mitocondrial con la sonda del RNA ribosomal 12S marcada con el fluorocromo FAM, y el DNA nuclear con la sonda del gen nuclear RNasa P marcada con el fluorocromo VIC.

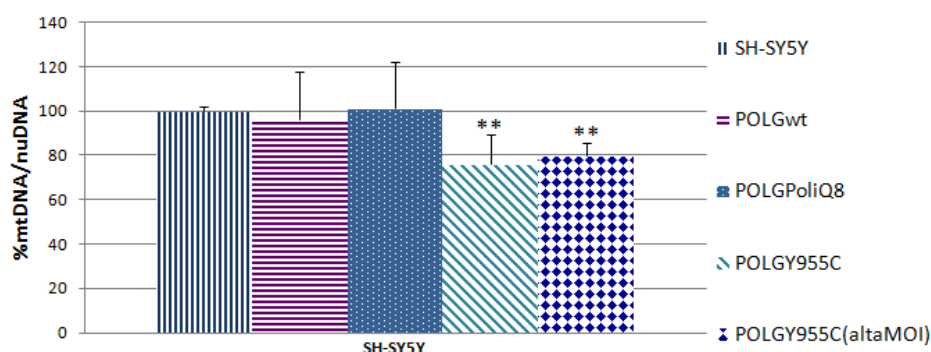


Figura 15. Cuantificación de mtDNA frente a la línea SH-SY5Y. Relación entre el DNA mitocondrial (mtDNA) y el DNA nuclear (nuDNA) en las SH-SY5Y, SH-SY5Y POLG^{wt} (POLGwt), SH-SY5Y POLG^{PoliQ8} (POLGPoliQ8), SH-SY5Y POLG^{Y955C} (POLGY955C) y SH-SY5Y POLG^{Y955C(altaMOI)} (POLGY955C(altaMOI)). *p<0.05, **p<0.005.

Las células transfectadas con la proteína POLG portadora de la mutación Y955C (SH-SY5Y POLG^{Y955C} y SH-SY5Y POLG^{Y955C(altaMOI)}) presentaban una disminución significativa (p<0.005) en la cantidad de DNA mitocondrial (mtDNA) frente a DNA nuclear (nDNA) en comparación con la línea SH-SY5Y (Figura 15). La disminución en la relación de mtDNA/nDNA de las líneas mutantes Y955C también resultó ser significativa (p<0.05) para la línea SH-SY5Y POLG^{wt} y para SH-SY5Y POLG^{PoliQ8} (datos no mostrados en el gráfico), respecto la línea control. En conclusión, los niveles de DNA mitocondrial disminuyeron frente al nuclear en las líneas celulares portadoras de POLG con la mutación Y955C.

5.2.3.3. Expresión de las proteínas de los complejos de la cadena de transporte de electrones en las líneas generadas

Puesto que una menor cantidad de DNA mitocondrial podría resultar en una reducción de la formación de los complejos respiratorios, se decidió realizar un Western Blot para detectar la expresión de las proteínas que forman los complejos de la cadena de transporte de electrones de la membrana interna mitocondrial en las líneas celulares generadas.

Se utilizó una mezcla de 5 anticuerpos monoclonales frente a proteínas de los complejos respiratorios (Total OXPHOS Human WB Antibody Cocktail, Tabla 5). La mezcla contiene 5 anticuerpos que reconocen: la subunidad NDUFB8 (18 KDa) del Complejo I, la subunidad SDHB (29 KDa) del Complejo II, la subunidad Core 2 (48 KDa) del Complejo III, la subunidad COX II (22 KDa) del Complejo IV y la subunidad alfa de la ATP sintasa (54 KDa) del Complejo V.

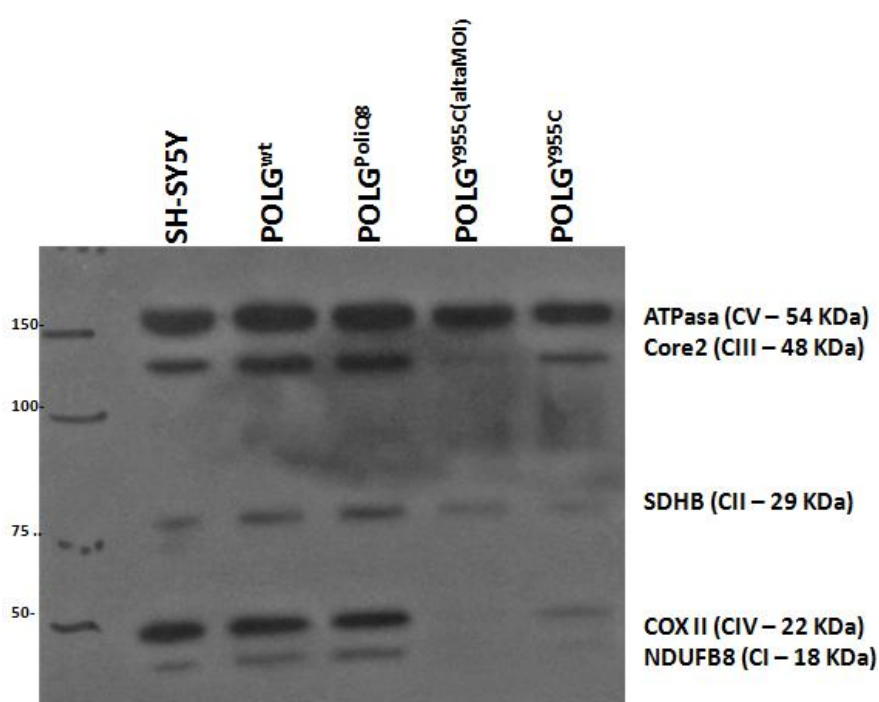


Figura 16. Inmunodetección de las subunidades de los complejos OXPHOS. (Gel del 12,5% AA/BA con 20 µg de muestra por calle). Se utilizó una mezcla de 5 anticuerpos monoclonales que reconocen: la subunidad NDUFB8 (18 KDa) del Complejo I, la subunidad SDHB (29 KDa) del Complejo II, la subunidad Core 2 (48 KDa) del Complejo III, la subunidad COX II (22 KDa) del Complejo IV y la subunidad alfa de la ATP sintasa (54 KDa) del Complejo V. Y se detectó en las líneas celulares generadas las SH-SY5Y, SH-SY5Y POLG^{wt} (POLG^{wt}), SH-SY5Y POLG^{PoliQ8} (POLG^{PoliQ8}), SH-SY5Y POLG^{Y955C} (POLG^{Y955C}) y SH-SY5Y POLG^{Y955C(altaMOI)} (POLG^{Y955C(altaMOI)}).

Se pudo observar en las líneas que expresan POLG con la mutación Y955C (SH-SY5Y POLG^{Y955C} y SH-SY5Y POLG^{Y955C(altaMOI)}) una menor expresión de las proteínas de los complejos CI, CIII y CIV de la cadena de transporte de electrones, que tienen subunidades codificadas por el DNA mitocondrial. Además, la expresión de la proteína del Complejo II también disminuyó, hecho que no se podría explicar por la mutación en la POLG, ya que las proteínas que forman el CII están codificadas por el DNA nuclear. Una posible explicación sería que la mitocondria, al no ser completamente funcional ya que presenta defectos en la cadena de transporte de electrones, se autodegrade más rápidamente por mitofagia (autofagia mitocondrial) [60] [61].

5.2.3.4. Detección de autofagia en las líneas celulares generadas

Para determinar si se da autofagia en las líneas celulares, puesto que el mejor indicador de autofagia es el ratio LC3-II/LC3-I o el ratio LC3-II/(LC3-I + LC3-II) [59], se realizó un Western Blot con el anticuerpo anti-LC3B para detectar LC3-I (16 KDa) y LC3II (14 KDa).

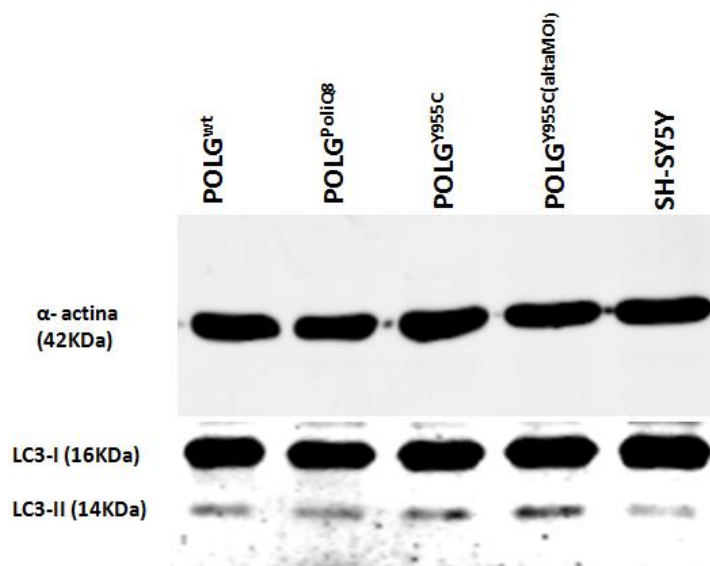


Figura 17. Inmunodetección de las proteínas indicadoras de autofagia LC3-I y LC3-II. (Geles de 14% AA/BA con 20 µg de muestra/calle). Se utilizó el anticuerpo policlonal anti-LC3 frente a las proteínas LC3-I (detección en gel a 16 KDa) y LC3-II (detección en gel a 14 KDa) en las líneas celulares SH-SY5Y, SH-SY5Y POLG^{wt} (POLG^{wt}), SH-SY5Y POLG^{PoliQ8} (POLG^{PoliQ8}), SH-SY5Y POLG^{Y955C} (POLG^{Y955C}) y SH-SY5Y POLG^{Y955C(altaMOI)} (POLG^{Y955C(altaMOI)}). Como control de carga se utilizó el anticuerpo anti-actina (42 KDa) en las mismas líneas celulares.

La proteína LC3-II tiene mayor peso molecular que LC3-I por la adición de fosfatidiletanolamina (PE). Además, LC3-II migra más rápido en SDS-PAGE probablemente por el extremo hidrofóbico de PE. Por ello, LC3-I se detecta en un gel a una masa molecular de 16 KDa y LC3-II aproximadamente a 14 KDa.

Debido a que las bandas de LC3-I del Western Blot estaban muy quemadas, y las de LC3-II prácticamente no detectables, no se pudo cuantificar mediante densitometría. Sin embargo, el resultado podría discutirse observando la autorradiografía. De manera visual, se podría concluir que las líneas celulares mutantes (SH-SY5Y POLG^{Y955C} y SH-SY5Y POLG^{Y955C(altaMOI)}) no presentaron autofagia, debido a que la intensidad de las bandas resultaba ser muy similar.

5.3. Generación de híbridos derivados de neuroblastoma que sobreexpresan variantes de POLG

Los híbridos son modelos celulares resultantes de la fusión de plaquetas (carentes de núcleo) de pacientes con enfermedades mitocondriales junto con células sin mtDNA (llamadas células p^0) [62]. Además, mediante mutagénesis dirigida, se pueden añadir complejidades nucleares [62-64]. Como la composición genética nuclear y el ambiente son equivalentes entre las diferentes líneas de híbridos, las diferencias en la función o en la estructura surgen mayormente de diferencias en el mtDNA [65] [62]. En 1996 la primera línea celular p^0 humana neuronal que se citó fue la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y [62, 66]. La misma que se ha utilizado en este trabajo.

Los haplotipos en genética humana están determinados por las variaciones encontradas en el DNA mitocondrial humano [67]. En nuestro caso, se disponía de tres híbridos de SH-SY5Y con cada uno de los haplotipos mitocondriales H, K y J. Con ellos se habían generado previamente híbridos que sobreexpresan la proteína POLG silvestre (POLG^{wt}); transfectados con la variación de POLG con el tracto de 8 glutaminas (POLG^{PoliQ8}) y híbridos control sin transfectar, para cada haplotipo mitocondrial (H, K, J).

La transfección celular se llevó a cabo mediante vectores (tal y como se describió en el apartado 5.1.), utilizando un plásmido que contenía clonado el gen que se deseaba expresar: POLG silvestre (POLG^{wt}) ó POLG con un tracto PoliQ de 8 glutaminas (POLG^{PoliQ8}). La población celular transfectada se seleccionó utilizando la resistencia a neomicina incluida en el vector.

En el presente trabajo de máster se han caracterizado 9 líneas híbridas mitocondriales del haplogrupo H: A51H, A51H POLG^{wt}, A51H POLG^{PoliQ8}, A58H, A58H POLG^{wt}, A58H POLG^{PoliQ8}, A114H, A114H POLG^{wt}, A114H POLG^{PoliQ8}; 9 del haplogrupo K: A3K, A3K POLG^{wt}, A3K POLG^{PoliQ8}, A110K, A110K POLG^{wt}, A110K POLG^{PoliQ8}, A131K, A131K POLG^{wt}, A131K POLG^{PoliQ8}; y 9 del haplogrupo J: 106J, 106J POLG^{wt}, 106J POLG^{PoliQ8}, 124J, 124J POLG^{wt}, 124J POLG^{PoliQ8}, 135J, 135J POLG^{wt}, 135J POLG^{PoliQ8}.

5.4. Caracterización de cíbridos derivados de neuroblastoma que sobreexpresan variantes de POLG

5.4.1. Análisis de transcritos de *POLG*

5.4.1.1. Análisis de las secuencias de *POLG* en los cíbridos generados

En este trabajo se comenzó secuenciando las diferentes líneas generadas para determinar la longitud del tracto PoliQ.

Primero, partiendo de RNA total obtenido de los cíbridos generados, se realizó una retrotranscripción para sintetizar el DNA complementario (cDNA), utilizando el Kit *Roche Transcriptor First Stand cDNA Synthesis* (Tabla 1). Para amplificar el tracto poliQ presente en la secuencia codificante del gen *POLG* se utilizó la DNA polimerasa *Phusion Hot Start II High Fidelity* (Tabla 1) con la pareja de oligonucleótidos POLGSmalR y POLG2F que amplificaban un fragmento de 1843 pb.

En el Anexo I, se muestra el electroferograma obtenido en la secuenciación mediante un oligonucleótido reverso del tracto PoliQ del transcrito de *POLG* en las líneas celulares generadas.

La flecha morada indica la dirección de la secuencia. En los electroferogramas se encuadran en rojo los codones CAA-CAG-CAG que codifican para las tres glutaminas conservadas, y a continuación se encuentran las glutaminas codificadas por CAG. En el caso de todos los cíbridos $POLG^{PoliQ8}$, las primeras 5 glutaminas corresponden al tracto variable, codificadas todas ellas por el codón CAG, mientras que las tres últimas glutaminas codificadas por los codones CAA-CAG-CAG son fijas. Debido a que el tracto de 8 glutaminas derivado de Bonobo se encuentra en heterocigosis, es posible observar secuencia doble con los picos de ambos alelos, el alelo de 13 Q y el de 8 Q, siendo el pico pequeño el alelo sobreexpresado (8 Q) y el grande el alelo de 13Q o endógeno. En todos los cíbridos $POLG^{PoliQ8}$ se observa esto, salvo en los cíbridos A3K $POLG^{PoliQ8}$ y A131K $POLG^{PoliQ8}$ en los que únicamente se lee la secuencia del alelo sobreexpresado de 8 glutaminas en los electroferogramas.

Tras determinar que todos los cíbridos generados $POLG^{PoliQ8}$ presentaban un tracto de 8 glutaminas, 5 Q en el tracto variable codificadas todas ellas por CAG y 3 Q conservadas; y que por el contrario los cíbridos $POLG^{wt}$ presentaban un tracto de 13 Q, 10 Q en el tracto variable codificadas por CAG y 3 Q conservadas; se continuó con la caracterización de las líneas celulares.

5.4.1.2. Cuantificación de la expresión del transcrito de *POLG* en los cíbridos generados

Para confirmar que los cíbridos generados expresaban las variantes de *POLG* esperadas, se cuantificó la expresión del transcrito de *POLG* mediante PCR cuantitativa (qPCR). Por una parte, se cuantificó la expresión del gen *POLG* endógeno para cada línea celular con un par de oligonucleótidos que hibridan en la región no codificante 5'UTR del gen. Y por otra parte, se cuantificó la expresión total del gen tras la transfección (endógeno y exógeno) mediante el diseño de cebadores dirigidos a la secuencia codificante.

Como control, se cuantificó la expresión del transcrito de *POLG* en los cíbridos sin transfectar, para así contemplar los posibles cambios compensatorios en la expresión del gen endógeno. Se realizaron duplicados biológicos, obteniendo de cada muestra de 6 a 8 medidas. Se muestra a continuación el número de veces que aumenta la expresión del transcrito en las líneas transfectadas respecto al control.

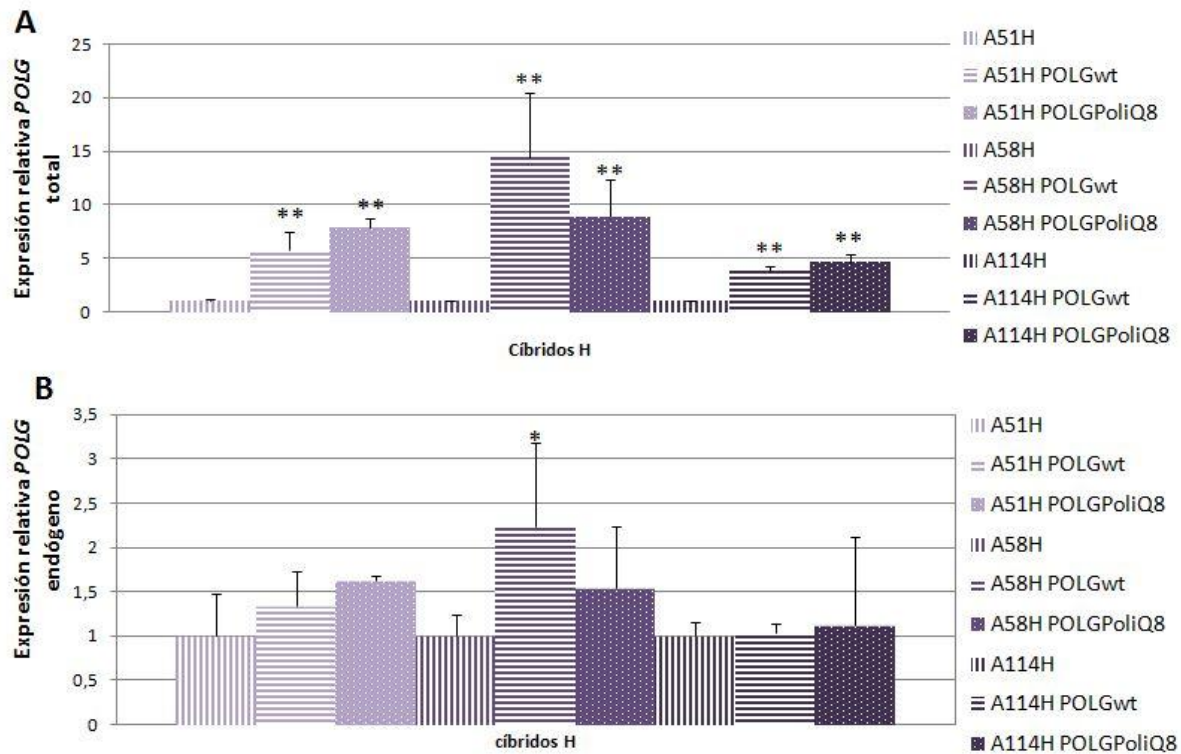


Figura 18. Cuantificación de la sobreexpresión del transcrito de *POLG* mediante q-PCR en los cíbridos del haplotipo mitocondrial H. A. Expresión relativa de *POLG* total en los cíbridos generados A51H, A51H POLG^{wt}, A51H POLG^{PoliQ8}, A58H, A58H POLG^{wt}, A58H POLG^{PoliQ8}, A114H, A114H POLG^{wt}, A114H POLG^{PoliQ8}. Se incluye la desviación estándar de las medidas. B. Expresión relativa de *POLG* total en los cíbridos generados. Se incluye la desviación estándar de las medidas. *p<0.05; **p<0.005 (siempre comparando POLG^{wt} y POLG^{PoliQ8} con su cíbrido control sin transfectar).

En todas las líneas cíbridas H que sobreexpresan variantes de *POLG*, los niveles de expresión de *POLG* aumentaron de manera significativa (Figura 18 A).

En los cíbridos A114H y A51H, la mayor sobreexpresión se daba cuando se transfectaba con POLG^{PoliQ8}, aumentando hasta 5 ó 6 veces su expresión respecto a sus cíbridos control, valores similares a cuando se transfectaba con POLG^{wt}. En cambio, en el cíbrido A58H, existía mayor diferencia entre POLG^{PoliQ8} y POLG^{wt}, siendo esta última la de mayor sobreexpresión: 13 veces mayor expresión que su cíbrido control.

La expresión del gen *POLG* endógeno únicamente varió significativamente respecto a la línea cíbrida sin transfectar en la línea A58H POLG^{wt} (Figura 18 B).

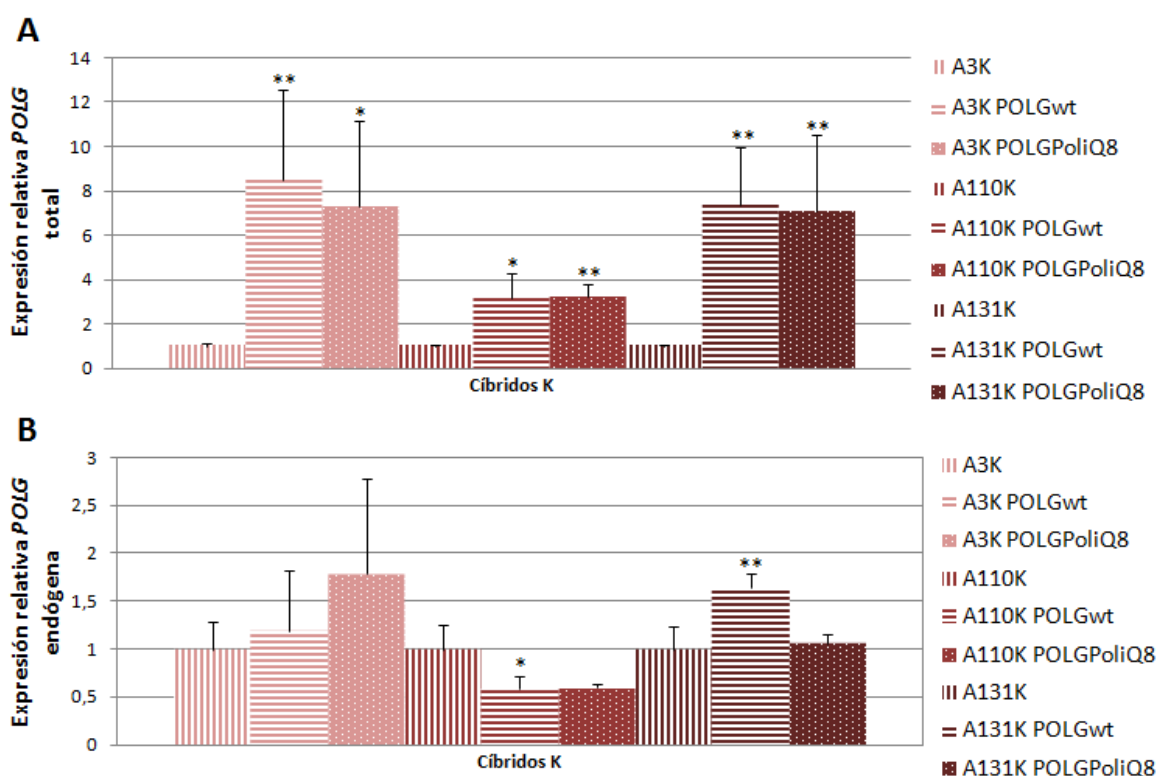


Figura 19. Cuantificación de la sobreexpresión del transcrito de *POLG* mediante q-PCR en los cíbridos del haplotipo mitocondrial K. A. Expresión relativa de *POLG* total en los cíbridos generados A3K, A3K *POLG*^{wt}, A3K *POLG*^{PoliQ8}, A110K, A110K *POLG*^{wt}, A110K *POLG*^{PoliQ8}, A131K, A131K *POLG*^{wt}, A131K *POLG*^{PoliQ8}. Se incluye la desviación estándar de las medidas. B. Expresión relativa de *POLG* total en los cíbridos generados. Se incluye la desviación estándar de las medidas. *p<0.05; **p<0.005 (siempre comparando *POLG*^{wt} y *POLG*^{PoliQ8} con su cíbrido control sin transfectar).

Al igual que ocurría con las líneas cíbridas H, en los cíbridos K transfectados con las variantes de la *POLG*, los niveles de mRNA totales aumentaron significativamente (Figura 19 A).

El cíbrido A3K presenta mayor expresión cuando se transfecta con *POLG*^{wt}, con valores de hasta 8 veces mayores que su cíbrido control, y los niveles de expresión del cíbrido A3K *POLG*^{PoliQ8} también son elevados, de hasta 7,3 veces mayor expresión que su control. En el cíbrido A131K, los valores de expresión son también bastante elevados, para el cíbrido transfectado con *POLG*^{wt} y con *POLG*^{PoliQ8} presentaban niveles de expresión de 7,4 y 7 veces mayores que su cíbrido control, respectivamente. Sin embargo, los niveles de expresión del cíbrido A110K cuando se transfectaba con *POLG*^{wt} y *POLG*^{PoliQ8} eran menores, del orden de 3 veces los de la línea control.

En el caso de los cíbridos A3K y A131K, al realizar la secuenciación de las líneas *POLG*^{PoliQ8}, solamente se leía la secuencia del alelo sobreexpresado de 8 glutaminas, hecho que se relaciona con los altos niveles de expresión del transcrito de *POLG* total en las qPCR.

La expresión del gen *POLG* endógeno varió significativamente respecto a la línea cíbrida sin transfectar en la línea A110K *POLG*^{wt} y A131K *POLG*^{wt} (Figura 19 B).

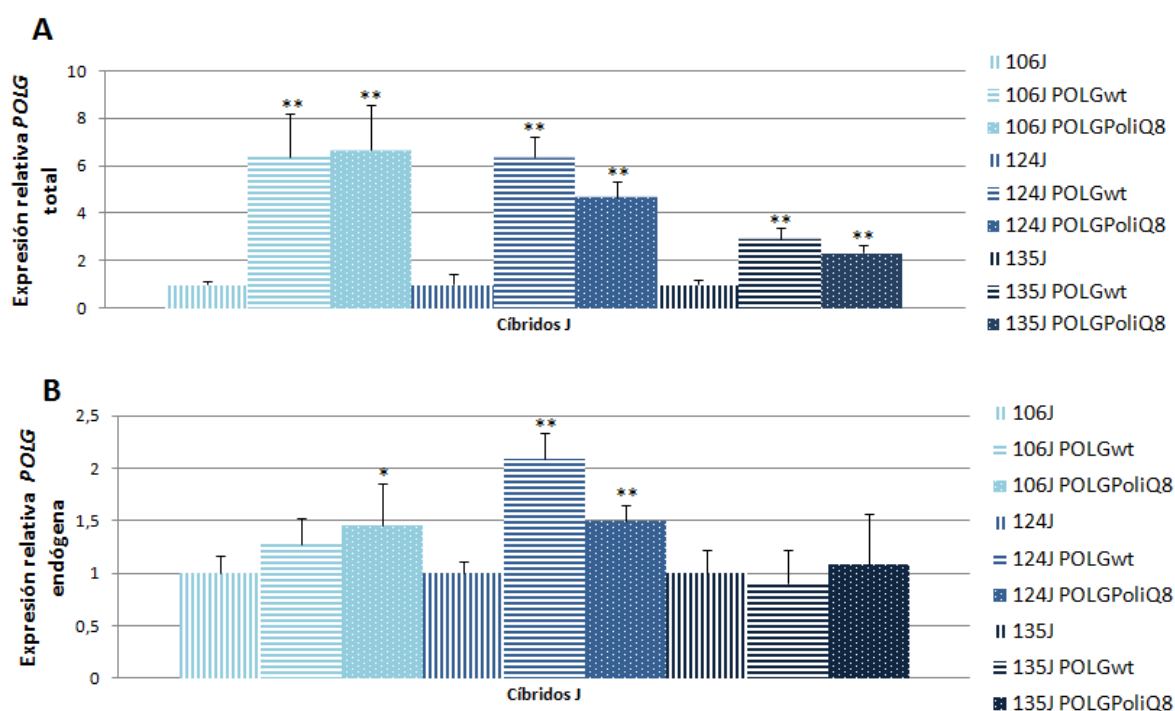


Figura 20. Cuantificación de la sobreexpresión del transcrito de *POLG* mediante q-PCR en los cíbridos del haplotipo mitocondrial J. A. Expresión relativa de *POLG* total en los cíbridos generados 106J, 106J *POLG*^{wt}, 106J *POLG*^{PolIQ8}, 124J, 124J *POLG*^{wt}, 124J *POLG*^{PolIQ8}, 135J, 135J *POLG*^{wt}, 135J *POLG*^{PolIQ8}. Se incluye la desviación estándar de las medidas. B. Expresión relativa de *POLG* total en los cíbridos generados. Se incluye la desviación estándar de las medidas. **p*<0.05; ***p*<0.005 (siempre comparando *POLG*^{wt} y *POLG*^{PolIQ8} con su Cíbrido control sin transfectar).

Con los cíbridos del haplotipo mitocondrial J ocurrió lo mismo que en los cíbridos H y K. Cuando se transfectaban con las variantes de *POLG*^{wt} y *POLG*^{PolIQ8} los niveles de mRNA totales aumentaban significativamente (Figura 20 A).

El cíbrido 106J presentaba similar expresión cuando se sobreexpresaban *POLG*^{wt} y con *POLG*^{PolIQ8}, hasta 6,4 y 6,65 veces mayor expresión que su control, respectivamente. Sin embargo, para los cíbridos 124J y 135J, la expresión era mayor en el cíbrido con *POLG*^{wt}, con valores de expresión de 6,35 y 3, respectivamente. Cuando los dos últimos cíbridos se transfectaron con la proteína *POLG*^{PolIQ8} los valores que presentaron fueron menores a los de las proteínas silvestres, pero no distaban demasiado a éstos, del orden de 4,5 y 2, respectivamente.

La expresión del gen *POLG* endógeno varió significativamente respecto a la línea cíbrida sin transfectar en la línea 106J *POLG*^{PolIQ8}, 124J *POLG*^{wt} y 124J *POLG*^{PolIQ8} (Figura 20 B).

5.4.2. Estudio de la proteína POLG

5.4.2.1. Detección de la proteína POLG en los cíbridos generados

Mediante un análisis Western Blot con el anticuerpo Primario anti-POLG producido en conejo se detectaron los niveles de expresión de la proteína. Se realizaron medidas de densitometría calculándose el porcentaje de sobreexpresión respecto a los cíbridos sin transfectar o control.

Las Figuras 21.1, 21.2 y 21.3 muestran la sobreexpresión de la proteína POLG (banda a 140 KDa) en los cíbridos H, K y J, respectivamente.

Cíbridos H

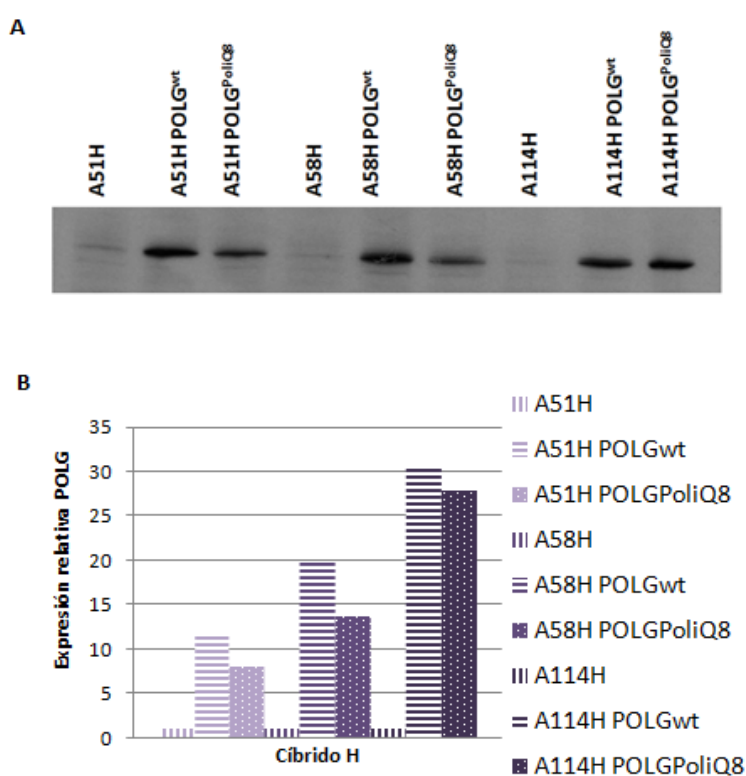


Figura 21.1. Inmunodetección de la proteína POLG en cíbridos del haplotipo mitocondrial H. A. Inmunodetección de la proteína POLG de 140 KDa en los cíbridos generados A51H, A51H POLG^{wt}, A51H POLG^{PoliQ8}, A58H, A58H POLG^{wt}, A58H POLG^{PoliQ8}, A114H, A114H POLG^{wt}, A114H POLG^{PoliQ8} (geles del 8% AA/BA con 40µg de muestra / calle). B. Cuantificación mediante densitometría (ImageJ) de la expresión de POLG en cada cíbrido generado respecto al cíbrido no transfectado correspondiente.

En el caso del haplogrupo mitocondrial H, los cíbridos A51H, A58H y A114H presentaban mayor expresión de proteína POLG cuando se transfectaba con la proteína silvestre (POLG^{wt}), del orden de 11, 20 y 30 veces mayores que su cíbrido control, respectivamente. Sin embargo, los valores de expresión de los cíbridos transfectados con proteínas POLG^{PoliQ8} no se alejaban demasiado de los transfectados con la proteína silvestre, del orden de 7, 14 y 27, respectivamente.

Cíbridos K

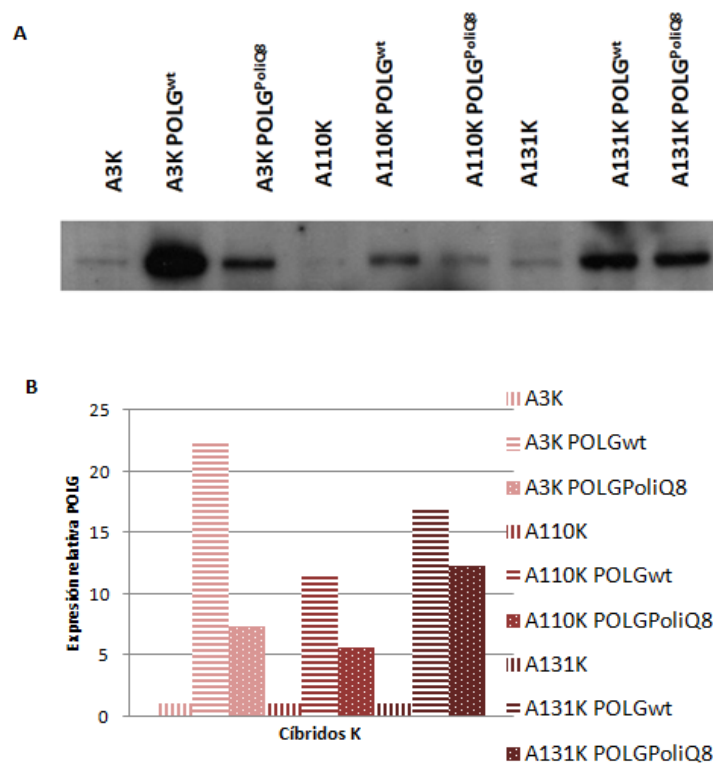


Figura 21.2. Inmunodetección de la proteína POLG en cíbridos del haplotipo mitocondrial K. A. Inmunodetección de la proteína POLG de 140 KDa en los cíbridos generados A3K, A3K POLG^{wt}, A3K POLG^{PoliQ8}, A110K, A110K POLG^{wt}, A110K POLG^{PoliQ8}, A131K, A131K POLG^{wt}, A131K POLG^{PoliQ8} (geles del 8% AA/BA con 40µg de muestra / calle). B. Cuantificación mediante densitometría (ImageJ) de la expresión de POLG en cada cíbrido generado respecto al cíbrido no transfectado correspondiente.

Los cíbridos del haplogrupo mitocondrial K, A3K, A110K y A131K, presentaron mayor sobreexpresión de POLG cuando se transfectaba con la variante silvestre, con valores de 23, 12 y 17 mayores que sus cíbridos controles, respectivamente. Cuando se transfectaba con la variante PoliQ8, los valores de expresión eran menores, del orden de 7, 5 y 12, respectivamente. En el caso del cíbrido A131K, los valores de la expresión fueron similares para ambas variantes de la proteína POLG.

Cíbridos J

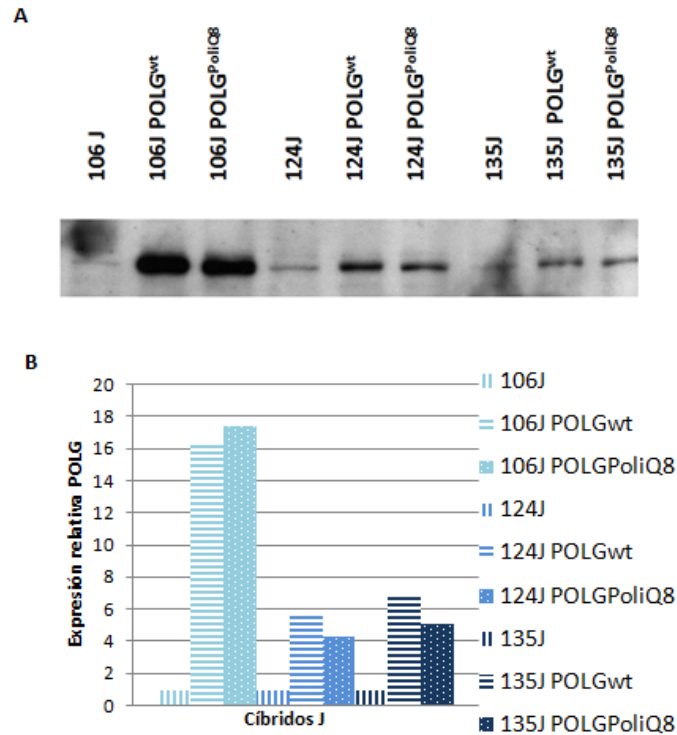


Figura 21.3. Inmunodetección de POLG en cíbridos del haplotipo mitocondrial J. A. Inmunodetección de la proteína POLG de 140 KDa en los cíbridos generados 106J, 106J POLG^{wt}, 106J POLG^{PoliQ8}, 124J, 124J POLG^{wt}, 124J POLG^{PoliQ8}, 135J, 135J POLG^{wt}, 135J POLG^{PoliQ8} (geles del 8% AA/BA con 40µg de muestra / calle). B. Cuantificación mediante densitometría (ImageJ) de la expresión de POLG en cada cíbrido generado respecto al cíbrido no transfectado correspondiente.

En el caso de los cíbridos del haplotipo mitocondrial J, de manera visual en el gel de Western Blot, la expresión de la proteína POLG es muy similar cuando se transfecta a los cíbridos con la proteína silvestre o con el tracto de 8 glutaminas. El cíbrido 106J presentaba los valores mayores de expresión al transfectar con la variante PoliQ8, similares a los obtenidos al transfectar con la variante silvestre de POLG. La densitometría dio valores de expresión para la variante silvestre de POLG de hasta 6 y 7 veces, para los cíbridos 124J y 131J, y de 4 y 5 para la proteína con el tracto de 8 glutaminas.

6. Discusión

6.1. Análisis de las secuencias de *POLG* en las líneas generadas

En este trabajo final de máster se escogió la mutación Y995C en *POLG*, correspondiente al cambio c.2864A>G en la secuencia codificante, de clase I [1]. Dicha mutación da lugar a una menor afinidad del enzima por los dNTPs e incrementa el ratio de error, resultando en la reducción de la catálisis del enzima [27]. Esta mutación, que da lugar a proteínas defectuosas, suele conferir un fenotipo dominante, probablemente porque los enzimas mutantes compiten eficazmente con los enzimas silvestres por la unión al DNA y causan error en la síntesis de DNA [1]. Por tanto, sería suficiente introducir una única copia del gen mutado en cada célula.

Sin embargo, al inicio de los experimentos, los valores de la expresión del gen para la mutación con una sola copia por célula eran muy bajos. Por consiguiente, se generaron células SH-SY5Y portadoras de la proteína *POLG* con la mutación Y995C con alta multiplicidad de infección, es decir, con más de una copia de gen mutado por célula. Finalmente, se consiguió observar cambios significativos entre las líneas celulares mutantes con una única copia de gen mutado por célula y el resto de líneas.

La secuenciación que se realizó de las diferentes líneas generadas para determinar el nucleótido presente en la posición 2864 de la secuencia codificante del gen *POLG* resultó ser la esperada para la línea celular SH-SY5Y *POLG*^{Y995C(altaMOI)}, que presentaba un nucleótido Guanina en lugar de Adenina. Por el contrario, no se pudo detectar el nucleótido de Guanina en la posición 2864 en la línea celular SH-SY5Y *POLG*^{Y995C}, posiblemente porque la amplificación se debiera a una de las dos copias de mRNA derivada de la *POLG* silvestre propia de la célula y no de la transfectada portadora de la mutación. A pesar de esto, se continuó con la caracterización de la línea celular.

Dado que se ha encontrado asociación entre la longitud del tracto de poliglutaminas presente en la DNA polimerasa mitocondrial gamma, en concreto con un tracto poliQ más corto, y la susceptibilidad a padecer Parkinson [40], se decidió generar líneas celulares y híbridos con una longitud de tracto de 8 Q (5 glutaminas del tracto variable y 3 Q finales conservadas codificadas por CAA-CAG-CAG) derivado de una especie de chimpancé denominada Bonobo.

Se introdujo una única copia del gen *POLG* de 8 Q en cada célula SH-SY5Y, conservando el otro alelo con 13 Q, por lo que las células se encontraban en heterocigosis para este gen. En la secuenciación, en algunos casos, únicamente se han podido detectar los picos del electroferograma del alelo sobreexpresado de 8 Q. Probablemente esto se deba a que hay mayor expresión de éste que del gen endógeno.

6.2. Análisis de las líneas SH-SY5Y generadas

Tras comprobar que las líneas celulares habían incorporado en su genoma la variación de la proteína *POLG* correspondiente (la mutación c.2864A>G o el tracto poliQ8) introducida mediante transfección lentiviral (salvo la línea celular SH-SY5Y *POLG*^{Y995C}) se cuantificó la expresión del gen correspondiente a la proteína *POLG* (*POLG* endógena) y la de *POLG* tras infectar con las variantes (*POLG* total). Todas las líneas transfectadas mostraron un aumento significativo de expresión de *POLG* total. La línea SH-SY5Y *POLG*^{PoliQ8} presentó los mayores valores significativos de expresión, seguida de la línea SH-SY5Y *POLG*^{wt} y SH-SY5Y *POLG*^{Y995C(altaMOI)}. Se observó menor incremento en la línea celular que expresaba la variante de *POLG* Y995C. La expresión del gen *POLG* endógeno se vio significativamente disminuida

en las líneas transfectadas con POLG^{PoliQ8} y POLG^{Y995C}, probablemente debido a mecanismos celulares que regulen el DNA endógeno.

El análisis mediante Western Blot permitió confirmar a nivel de expresión proteica los resultados de cuantificación de mRNA obtenidos, correspondiéndose con los resultados de la expresión del gen *POLG*. La mayor sobreexpresión de la proteína POLG tuvo lugar al transfectar con la variante del tracto de 8 glutaminas, valor muy similar al de la proteína silvestre. Igual ocurrió con la línea mutante SH-SY5Y POLG^{Y995C}, presentando la menor tasa de sobreexpresión, porque expresa menos transcrito con la mutación.

Tanto en los análisis de los transcritos como de las proteínas, la línea celular transfectada con la variante de POLG que contiene el tracto de 8 glutaminas presenta las mayores tasas de expresión (POLG^{PoliQ8}), lo cual coincide con el hecho de que en la secuenciación solo puedan leerse los picos procedentes del alelo de 8 Q, pudiendo indicar una gran tasa de incorporación del gen de interés al genoma de la línea celular.

Por otra parte, mediante microscopía de fluorescencia se observó una localización mitocondrial de la proteína POLG. Confirmando los análisis anteriormente comentados, la distribución de POLG en la línea celular con la mutación Y995C fue más difusa y uniforme, hecho que corresponde con menores niveles de mRNA y proteína obtenidos en esta variante.

Las células SH-SY5Y que expresan la variante POLG con la mutación Y995C (SH-SY5Y POLG^{Y995C} y SH-SY5Y POLG^{Y995C(altaMOI)}) presentaron una disminución significativa del consumo de oxígeno en comparación con las células que expresan la proteína POLG^{wt} y POLG^{PoliQ8}, al igual que la línea control.

También se obtuvo una disminución significativa en la cantidad de DNA mitocondrial frente a DNA nuclear en las líneas celulares portadoras de la proteína POLG mutada (SH-SY5Y POLG^{Y995C} y SH-SY5Y POLG^{Y995C(altaMOI)}). Estos resultados sugieren que la proteína POLG de la línea SH-SY5Y POLG^{Y995C} es portadora de la mutación, a pesar de no haber sido detectada mediante la secuenciación. Defectos funcionales severos en proteínas esenciales para la replicación del mtDNA (POLG) pueden causar Síndromes de depleción de DNA mitocondrial. En estos casos, la síntesis y reparación del mtDNA no pueden mantenerse y segregan correctamente hacia las células hijas, provocando una disminución en la cantidad de genomas mitocondriales. Como el mtDNA codifica varias subunidades de los complejos I, III, IV y ATP sintasa de la cadena respiratoria, la depleción del mtDNA causa una deficiencia de los complejos I, III y IV de la cadena respiratoria y un defecto en la síntesis de ATP [68]. Se analizaron los niveles de expresión de las proteínas de los complejos mitocondriales en las líneas celulares, en el caso de las líneas celulares que expresan la variante de POLG con la mutación Y995C, la expresión de las subunidades de los complejos de la cadena respiratoria se vio disminuida frente al control. Como cabía esperar, la actividad de los complejos I, III, IV y la ATP sintasa se vio afectada. Sin embargo, la subunidad SDHB del Complejo II, a pesar de no estar codificada en el mtDNA, también presentaba una expresión reducida en las líneas mutantes frente al control. Una hipótesis que se barajó fue que se diera autofagia en esta línea celular, ya que puede darse cuando la mitocondria no mantiene los niveles de ATP, está dañada o no es completamente funcional [61] [69]. Sin embargo, se rechazó al comprobarlo por Western Blot.

6.3. Análisis de los híbridos generados

Después de comprobar mediante secuenciación que los híbridos obtenidos habían incorporado en su genoma la variación de la proteína POLG correspondiente, el tracto de 8 glutaminas, introducida mediante transfección lentiviral, al igual que la variante silvestre de la proteína POLG, se cuantificó la expresión del transcrito de *POLG* (POLG endógena) y la expresión del transcrito de *POLG* tras infectar con los virus (POLG total). Se observó que en todas las líneas híbridas los niveles de expresión de *POLG* total aumentaron de manera significativa.

En todas las líneas híbridas de los tres haplogrupos que sobreexpresan variantes de POLG, los niveles de expresión de *POLG* total aumentaron de manera significativa. Sin embargo, las tasas de sobreexpresión de las variantes de POLG varían entre haplogrupos.

En el caso del haplogrupo H, los híbridos A114H y A51H presentaron valores similares de sobreexpresión cuando se transfectaba con la proteína silvestre y con la PoliQ8, siendo significativamente mayores cuando se transfectaba con la $POLG^{PoliQ8}$. En cambio, la mayor tasa de sobreexpresión en el híbrido A58H se dio con la variante $POLG^{wt}$.

Por otro lado, los híbridos con el haplogrupo K presentaban similares tasas de sobreexpresión para la variante $POLG^{wt}$ y para $POLG^{PoliQ8}$, en el caso de los híbridos A3K y A131K, los valores de expresión son elevados respecto a los del híbrido A110K. Los elevados niveles de expresión del transcrito de POLG total en A3K y A131K corresponden con la lectura de la secuenciación de *POLG*, en la cual solamente se detectaba la secuencia del alelo sobreexpresado de 8 glutaminas.

En último lugar, los híbridos con el haplogrupo mitocondrial J, presentaban dos tendencias, en el caso del 106J, presentaba similar expresión cuando se sobreexpresaba con $POLG^{wt}$ y $POLG^{PoliQ8}$; en cambio, los híbridos 124J y 135J la expresión era mayor cuando se transfectaba con la variante $POLG^{wt}$.

A continuación, se realizaron análisis Western Blot para detectar los niveles de expresión de la proteína POLG, y se realizaron medidas de densitometría.

En el caso de la sobreexpresión de la proteína POLG en los híbridos del haplogrupo mitocondrial H, todos híbridos presentaron mayor expresión de POLG al transfectarlos con la variante silvestre, sin embargo, en el caso de los híbridos A114H y A51H, los valores de expresión de la variante PoliQ8 resultaron similares que los de las proteínas silvestres.

En el caso de la expresión de la proteína POLG, la variante $POLG^{wt}$ presentó mayor expresión en los híbridos del haplotipo mitocondrial K. En el híbrido A131K la expresión de ambas variantes podría considerarse similar.

La tasa de sobreexpresión de las variantes silvestre y PoliQ8 de POLG en los híbridos J resultaron ser muy similares, siendo un poco mayores los valores de expresión para los híbridos 124J y 135J transfectados con la proteína silvestre, y en cambio, para el híbrido 106J se dio mayor sobreexpresión al transfectar con la variante PoliQ8.

Los resultados indican que la sobreexpresión de la variante silvestre ($POLG^{wt}$) y la PoliQ8 ($POLG^{PoliQ8}$) para cada uno de los cíbridos es semejante. Por lo tanto, esto permitirá comparar ambas variantes entre sí en futuros estudios.

Debido a que la composición genética nuclear y el ambiente son equivalentes entre las diferentes líneas de cíbridos, las diferencias en la función o en la estructura surgen mayormente de diferencias en el mtDNA [65] [62]. Para comparar los cíbridos generados, tras obtener los niveles de expresión de *POLG* y de la proteína POLG, el siguiente paso sería realizar análisis funcionales de consumo de oxígeno o de cuantificación del número de copias de DNA mitocondrial, como también analizar la función OXPHOS.

7. Conclusiones

Los estudios genéticos, moleculares y funcionales realizados en este Trabajo Fin de Máster han permitido caracterizar líneas celulares derivadas de la línea de neuroblastoma SH-SY5Y, escogida por su potencial para diferenciarse a neuronas dopaminérgicas. Estas líneas se utilizarán en estudios de la degeneración neuronal en enfermedades mitocondriales, y del efecto de la disfunción OXPHOS en la Enfermedad del Parkinson.

1. Se han cuantificado los niveles de expresión del gen y la proteína POLG en las líneas celulares sobreexpresando las variantes POLG^{wt}, POLG^{Y995C} y POLG^{PoliQ8}. Los transcritos aumentaron entre aproximadamente 6 veces respecto a la línea control excepto en la línea SH-SY5Y POLG^{Y995C} (baja dosis) que aumentó 3,8 veces. Los niveles de proteína en esta línea celular fueron 3 veces menores que en las demás líneas sobreexpresadas.
2. Se ha demostrado que la mutación patológica dominante Y995C de la DNA polimerasa mitocondrial gamma en la línea celular SH-SY5Y afecta a la replicación del DNA mitocondrial, resultando en menor número de copias y menor respiración celular.
3. No se ha detectado aumento de mitofagia debida a la presencia de la mutación POLG^{Y995C}.
4. La variante de POLG con la mutación Y995C en la línea SH-SY5Y (SH-SY5Y POLG^{Y995C}) tiene efecto funcional, a pesar de que no fue posible detectarla mediante secuenciación.
5. El estudio de las 9 líneas híbridas (3 del haplogrupo H, 3 del haplogrupo K y 3 del haplogrupo J), y esas mismas líneas sobreexpresando variantes de POLG, ha mostrado que los niveles de sobreexpresión de transcrito y proteína POLG^{wt} ó POLG^{PoliQ8}, son similares entre sí para cada híbrido. Esto permitirá continuar con estudios funcionales utilizando dichas líneas.

Conclusions

The genetic, molecular and functional studies performed in this project have allowed us to characterize cell lines derived from SH-SY5Y neuroblastoma, chosen because its potential to differentiate into dopamine neurons. These cell lines will be used in future studies of neuronal degeneration in mitochondrial diseases, and the OXPHOS dysfunction in Parkinson disease.

1. We have quantified the *POLG* gene expression levels and POLG protein levels in the cell lines overexpressing POLG^{wt}, POLG^{Y995C} and POLG^{PoliQ8}. The transcripts levels increased almost 6 times over the control, apart from the SH-SY5Y POLG^{Y995C} (low MOI) cell line where it was only 3,8 times with respect to the control. The protein levels in SH-SY5Y POLG^{Y995C} (low MOI) were three times lower than in the other cell lines.
2. We have shown that the Y995C pathologic mutation in the DNA polymerase gamma affects replication resulting in lower mtDNA copy number and lower mitochondrial oxygen consumption in the cell line SH-SY5Y.
3. We have not found any increase in mitophagy in the cell line carrying the POLG^{Y995C} mutation.
4. The POLG variant with the Y995C mutation in the SH-SY5Y cell line (SH-SY5Y POLG^{Y995C}) shows a functional effect although it was not possible to detect it through sequencing.

5. The 9 transmitochondrial cybrid cell lines (H, K and J haplogroups) derived from neuroblastoma overexpressing the POLG variants show that the POLG^{wt} or POLG^{PoliQ8} transcript and protein levels are very similar for every haplogroup. This will allow us to use them for the functional studies ahead.

8. Perspectivas futuras

Tras caracterizar a nivel genético, molecular y funcional las líneas celulares derivadas de neuroblastoma sobreexpresando POLG silvestre, POLG con una variante portadora de una mutación autosómica dominante y POLG con una variante previamente asociada a Parkinson, el siguiente paso consiste en la diferenciación a neuronas dopaminérgicas, y la caracterización del efecto de mutaciones patológicas de la POLG en la diferenciación neuronal y en el sistema OXPHOS de neuronas maduras.

Con los híbridos transmitocondriales caracterizados genética y molecularmente, se podrían realizar análisis funcionales y, a continuación, estudiar el efecto combinado que puedan tener variaciones genéticas mitocondriales y nucleares en la diferenciación a neurona dopaminérgica, ya que debido a sus características servirían de gran utilidad para aclarar las complejas relaciones entre factores que desencadenan enfermedades con una implicación mitocondrial. Además, se completará el estudio analizando el efecto en estas líneas de diferentes fármacos que afectan a la función OXPHOS, y que han sido relacionados con la Enfermedad del Parkinson.

9. Bibliografía

1. Lee, Y.S., W.D. Kennedy, and Y.W. Yin, *Structural insight into processive human mitochondrial DNA synthesis and disease-related polymerase mutations*. Cell, 2009. **139**(2): p. 312-24.
2. Taylor, R.W. and D.M. Turnbull, *Mitochondrial DNA mutations in human disease*. Nat Rev Genet, 2005. **6**(5): p. 389-402.
3. Saxton, W.M. and P.J. Hollenbeck, *The axonal transport of mitochondria*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 9): p. 2095-104.
4. Attardi, G. and G. Schatz, *Biogenesis of mitochondria*. Annu Rev Cell Biol, 1988. **4**: p. 289-333.
5. Green, D.R., *Apoptotic pathways: ten minutes to dead*. Cell, 2005. **121**(5): p. 671-4.
6. Bianchi, K., et al., *Calcium and mitochondria: mechanisms and functions of a troubled relationship*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1742**(1-3): p. 119-31.
7. Turrens, J.F., *Mitochondrial formation of reactive oxygen species*. J Physiol, 2003. **552**(Pt 2): p. 335-44.
8. Lapuente-Brun, E., et al., *Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain*. Science, 2013. **340**(6140): p. 1567-70.
9. Anderson, S., et al., *Sequence and organization of the human mitochondrial genome*. Nature, 1981. **290**(5806): p. 457-65.
10. Wallace, D.C., *Mitochondria and cancer: Warburg addressed*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2005. **70**: p. 363-74.
11. Montoya, J., et al., *20 years of human mtDNA pathologic point mutations: carefully reading the pathogenicity criteria*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1787**(5): p. 476-83.
12. Smigrodzki, R., J. Parks, and W.D. Parker, *High frequency of mitochondrial complex I mutations in Parkinson's disease and aging*. Neurobiol Aging, 2004. **25**(10): p. 1273-81.
13. Finsterer, J., *Mitochondriopathies*. Eur J Neurol, 2004. **11**(3): p. 163-86.
14. Naviaux, R.K., *Mitochondrial DNA disorders*. Eur J Pediatr, 2000. **159 Suppl 3**: p. S219-26.
15. Larsson, N.G. and D.A. Clayton, *Molecular genetic aspects of human mitochondrial disorders*. Annu Rev Genet, 1995. **29**: p. 151-78.

16. Leonard, J.V. and A.H. Schapira, *Mitochondrial respiratory chain disorders I: mitochondrial DNA defects*. Lancet, 2000. **355**(9200): p. 299-304.
17. Morten, K.J., et al., *Liver mtDNA content increases during development: a comparison of methods and the importance of age- and tissue-specific controls for the diagnosis of mtDNA depletion*. Mitochondrion, 2007. **7**(6): p. 386-95.
18. Lee, N.C., et al., *Simultaneous detection of mitochondrial DNA depletion and single-exon deletion in the deoxyguanosine gene using array-based comparative genomic hybridisation*. Arch Dis Child, 2009. **94**(1): p. 55-8.
19. Montoya, J., et al., *Enfermedades del ADN mitocondrial*. Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia, 2012.
20. Gray, H. and T.W. Wong, *Purification and identification of subunit structure of the human mitochondrial DNA polymerase*. J Biol Chem, 1992. **267**(9): p. 5835-41.
21. Stumpf, J.D., R.P. Saneto, and W.C. Copeland, *Clinical and molecular features of POLG-related mitochondrial disease*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(4): p. a011395.
22. Zeviani, M. and S. Di Donato, *Mitochondrial disorders*. Brain, 2004. **127**(Pt 10): p. 2153-72.
23. Chinnery, P.F. and M. Zeviani, *155th ENMC workshop: polymerase gamma and disorders of mitochondrial DNA synthesis, 21-23 September 2007, Naarden, The Netherlands*. Neuromuscul Disord, 2008. **18**(3): p. 259-67.
24. Wallace, D.C., *A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine*. Annu Rev Genet, 2005. **39**: p. 359-407.
25. Trifunovic, A., et al., *Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase*. Nature, 2004. **429**(6990): p. 417-23.
26. Edgar, D. and A. Trifunovic, *The mtDNA mutator mouse: Dissecting mitochondrial involvement in aging*. Aging (Albany NY), 2009. **1**(12): p. 1028-32.
27. Graziewicz, M.A., et al., *Structure-function defects of human mitochondrial DNA polymerase in autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia*. Nat Struct Mol Biol, 2004. **11**(8): p. 770-6.
28. Luoma, P., et al., *Parkinsonism, premature menopause, and mitochondrial DNA polymerase gamma mutations: clinical and molecular genetic study*. Lancet, 2004. **364**(9437): p. 875-82.
29. Ponamarev, M.V., et al., *Active site mutation in DNA polymerase gamma associated with progressive external ophthalmoplegia causes error-prone DNA synthesis*. J Biol Chem, 2002. **277**(18): p. 15225-8.
30. Lewis, W., et al., *Decreased mtDNA, oxidative stress, cardiomyopathy, and death from transgenic cardiac targeted human mutant polymerase gamma*. Lab Invest, 2007. **87**(4): p. 326-35.
31. Hakonen, A.H., et al., *Mitochondrial DNA polymerase W748S mutation: a common cause of autosomal recessive ataxia with ancient European origin*. Am J Hum Genet, 2005. **77**(3): p. 430-41.
32. Nguyen, K.V., et al., *Molecular diagnosis of Alpers syndrome*. J Hepatol, 2006. **45**(1): p. 108-16.
33. Cohen, B.H. and R.K. Naviaux, *The clinical diagnosis of POLG disease and other mitochondrial DNA depletion disorders*. Methods, 2010. **51**(4): p. 364-73.
34. Tzoulis, C., et al., *Molecular pathogenesis of polymerase gamma-related neurodegeneration*. Ann Neurol, 2014. **76**(1): p. 66-81.
35. Hall, C.N., et al., *Oxidative phosphorylation, not glycolysis, powers presynaptic and postsynaptic mechanisms underlying brain information processing*. J Neurosci, 2012. **32**(26): p. 8940-51.
36. Rugarli, E.I. and T. Langer, *Mitochondrial quality control: a matter of life and death for neurons*. Embo j, 2012. **31**(6): p. 1336-49.
37. Mortiboys, H., et al., *Mitochondrial function and morphology are impaired in parkin-mutant fibroblasts*. Ann Neurol, 2008. **64**(5): p. 555-65.

38. Lopez-Gallardo, E., et al., *OXPHOS toxicogenomics and Parkinson's disease*. Mutat Res, 2011. **728**(3): p. 98-106.
39. Chan, S.S. and W.C. Copeland, *DNA polymerase gamma and mitochondrial disease: understanding the consequence of POLG mutations*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1787**(5): p. 312-9.
40. Eerola, J., et al., *POLG1 polyglutamine tract variants associated with Parkinson's disease*. Neurosci Lett, 2010. **477**(1): p. 1-5.
41. Anvret, A., et al., *Variations of the CAG trinucleotide repeat in DNA polymerase gamma (POLG1) is associated with Parkinson's disease in Sweden*. Neurosci Lett, 2010. **485**(2): p. 117-20.
42. Brown, M.D., F. Sun, and D.C. Wallace, *Clustering of Caucasian Leber hereditary optic neuropathy patients containing the 11778 or 14484 mutations on an mtDNA lineage*. Am J Hum Genet, 1997. **60**(2): p. 381-7.
43. van der Walt, J.M., et al., *Mitochondrial polymorphisms significantly reduce the risk of Parkinson disease*. Am J Hum Genet, 2003. **72**(4): p. 804-11.
44. Ruiz-Pesini, E., et al., *Human mtDNA haplogroups associated with high or reduced spermatozoa motility*. Am J Hum Genet, 2000. **67**(3): p. 682-96.
45. Torroni, A., et al., *Mitochondrial DNA haplogroups do not play a role in the variable phenotypic presentation of the A3243G mutation*. Am J Hum Genet, 2003. **72**(4): p. 1005-12.
46. Herrnstadt, C., et al., *Reduced-median-network analysis of complete mitochondrial DNA coding-region sequences for the major African, Asian, and European haplogroups*. Am J Hum Genet, 2002. **70**(5): p. 1152-71.
47. Torroni, A. and D.C. Wallace, *Mitochondrial DNA variation in human populations and implications for detection of mitochondrial DNA mutations of pathological significance*. J Bioenerg Biomembr, 1994. **26**(3): p. 261-71.
48. Macaulay, V., et al., *The emerging tree of West Eurasian mtDNAs: a synthesis of control-region sequences and RFLPs*. Am J Hum Genet, 1999. **64**(1): p. 232-49.
49. Finnila, S., M.S. Lehtonen, and K. Majamaa, *Phylogenetic network for European mtDNA*. Am J Hum Genet, 2001. **68**(6): p. 1475-84.
50. Torroni, A., et al., *Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations*. Genetics, 1996. **144**(4): p. 1835-50.
51. Delhumeau, G., A.M. Cruz-Mendoza, and C. Gomez Lojero, *Protection of cytochrome c oxidase against cyanide inhibition by pyruvate and alpha-ketoglutarate: effect of aeration in vitro*. Toxicol Appl Pharmacol, 1994. **126**(2): p. 345-51.
52. Hargreaves, I.P., et al., *Inhibition of mitochondrial complex IV leads to secondary loss complex II-III activity: Implications for the pathogenesis and treatment of mitochondrial encephalomyopathies*. Mitochondrion, 2007. **7**(4): p. 284-287.
53. Heid, C.A., et al., *Real time quantitative PCR*. Genome Res, 1996. **6**(10): p. 986-94.
54. Nixon, R.A., *Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer disease*. Journal of Cell Science, 2007. **120**(23): p. 4081-4091.
55. Nixon, R.A., *Autophagy in neurodegenerative disease: friend, foe or turncoat?* Trends in Neurosciences, 2006. **29**(9): p. 528-535.
56. Ryan, B.J., et al., *Mitochondrial dysfunction and mitophagy in Parkinson's: from familial to sporadic disease*. Trends in Biochemical Sciences, 2015. **40**(4): p. 200-210.
57. Kabeya, Y., et al., *LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing*. Embo j, 2000. **19**(21): p. 5720-8.
58. Kabeya, Y., et al., *LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 13): p. 2805-12.
59. Mizushima, N. and T. Yoshimori, *How to interpret LC3 immunoblotting*. Autophagy, 2007. **3**(6): p. 542-5.
60. Schapira, A.H.V. and M. Gegg, *Mitochondrial Contribution to Parkinson's Disease Pathogenesis*. Parkinson's Disease, 2011. **2011**: p. 7.

61. Chen, Y., et al., *Mitochondrial electron-transport-chain inhibitors of complexes I and II induce autophagic cell death mediated by reactive oxygen species*. J Cell Sci, 2007. **120**(Pt 23): p. 4155-66.
62. Swerdlow, R.H., *Does mitochondrial DNA play a role in Parkinson's disease? A review of cybrid and other supportive evidence*. Antioxid Redox Signal, 2012. **16**(9): p. 950-64.
63. Poste, G. and P. Reeve, *Enucleation of mammalian cells by cytochalasin B. II. Formation of hybrid cells and heterokaryons by fusion of anucleate and nucleated cells*. Exp Cell Res, 1972. **73**(2): p. 287-94.
64. Trimmer, P.A. and J.P. Bennett, Jr., *The cybrid model of sporadic Parkinson's disease*. Exp Neurol, 2009. **218**(2): p. 320-5.
65. Ghosh, S.S., et al., *Use of cytoplasmic hybrid cell lines for elucidating the role of mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease and Parkinson's disease*. Ann N Y Acad Sci, 1999. **893**: p. 176-91.
66. Miller, S.W., et al., *Creation and characterization of mitochondrial DNA-depleted cell lines with "neuronal-like" properties*. J Neurochem, 1996. **67**(5): p. 1897-907.
67. Torroni, A., et al., *mtDNA haplogroups and frequency patterns in Europe*. Am J Hum Genet, 2000. **66**(3): p. 1173-7.
68. Suomalainen, A. and P. Isohanni, *Mitochondrial DNA depletion syndromes--many genes, common mechanisms*. Neuromuscul Disord, 2010. **20**(7): p. 429-37.
69. Levine, B. and J. Yuan, *Autophagy in cell death: an innocent convict?* J Clin Invest, 2005. **115**(10): p. 2679-88.

Electroferograma obtenido en la secuenciación del gen *POLG* en los híbridos generados. Código de colores de bases nitrogenadas: adenina (A): verde, timina (T): rojo, guanina (G): negro, citosina (C): azul. La dirección de la secuenciación está indicada por la fecha morada, de derecha a izquierda.

